

**HUBUNGAN ANTARA EKSPRESI KOLAGEN-1 JARINGAN HATI TERHADAP
DERAJAT FIBROSIS HATI PADA TIKUS MODEL FIBROSIS HATI**

TUGAS AKHIR

**Untuk Memenuhi Persyaratan
Memperoleh Gelar Sarjana Kedokteran**



**Oleh:
Florecentia Candra Mustika
NIM. 155070101111043**

**PROGRAM STUDI KEDOKTERAN
FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG
2019**

HALAMAN PENGESAHAN
TUGAS AKHIR
HUBUNGAN ANTARA EKSPRESI KOLAGEN-1 JARINGAN HATI TERHADAP
DERAJAT FIBROSIS HATI PADA TIKUS MODEL FIBROSIS HATI

Oleh:

Florecentia Candra Mustika

NIM. 155070101111043

Telah diuji pada

Hari : Selasa

Tanggal : 9 April 2019

Dan dinyatakan lulus oleh:

Penguji-I

dr. Saptadi Yulianto, M.Kes, Sp. A (K)

NIP. 198009202012121003

Pembimbing-I/Penguji-II,

Pembimbing-II/Penguji-III,

dr. Supriono Sp. PD-KGEH

NIP. 196605171998031004

dr. Satrio Wibowo, Sp. A, Msi, Med

NIP. 197705062008121009

Mengetahui,

Ketua Program Studi Kedokteran

dr. Triwahju Astuti, M.Kes, Sp.P(K)

NIP: 196310221996012001

PERNYATAAN KEASLIAN TULISAN

Saya yang bertandatangan di bawah ini:

Nama : Florecentia Candra Mustika

NIM : 155070101111043

Program Studi : Program Studi Kedokteran

Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya

Menyatakan dengan sebenarnya bahwa Tugas Akhir yang saya tulis ini benar-benar hasil karya saya sendiri, bukan merupakan pengambil-alihan tulisan atau pikiran orang lain yang saya akui sebagai tulisan atau pikiran saya. Apabila di kemudian hari dapat dibuktikan bahwa Tugas Akhir ini adalah hasil jiplakan, maka saya bersedia menerima sanksi atas perbuatan tersebut.

Malang, April 2019

Yang membuat pernyataan

Florecentia Candra Mustika

NIM. 155070101111043

KATA PENGANTAR

Puji syukur penulis panjatkan kehadiran Allah SWT atas segala limpahan rahmat dan hidayahNya, sehingga penulis dapat menyelesaikan penyusunan tugas akhir untuk memperoleh gelar sarjana kedokteran di Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya dengan judul “Hubungan antara Ekspresi Kolagen-1 Jaringan Hati terhadap Derajat Fibrosis Hati pada Tikus Model Fibrosis Hati”.

Pemilihan topik ini didasarkan oleh ketertarikan penulis terhadap penelitian *in vivo* atau pada hewan coba. Selain itu, juga ketertarikan penulis terhadap perkembangan ilmu mengenai penyakit fibrosis hati yang menjadi salah satu permasalahan pada divisi ilmu penyakit dalam.

Dengan selesainya tugas akhir ini, penulis menyampaikan terimakasih yang sebesar-besarnya kepada:

1. Allah SWT yang telah memberi kelancaran dan senantiasa memberi kemudahan selama penulisan Tugas Akhir ini.
2. dr. Supriono Sp. PD-KGEH, selaku pembimbing pertama yang senantiasa memberikan bimbingan, motivasi, dan dengan sabar memberikan arahan selama penyusunan tugas akhir ini.
3. dr. Satrio Wibowo, Sp. A(K), M.Si,Med , selaku pembimbing kedua saya yang senantiasa memberikan bimbingan, masukan, dan arahan sehingga tugas akhir saya dapat terselesaikan.
4. dr. Saptadi Yulianto, M.Kes, Sp.A(K), selaku penguji saya yang membantu dalam menilai dan memberi saran serta arahan sehingga tugas akhir saya menjadi lebih baik.

5. Dr. dr. Wisnu Barlianto, Sp. A(K), M.Si,Med ,selaku Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang beserta jajarannya yang telah memberikan izin, fasilitas, dan kesempatan sehingga penulis dapat menempuh dan menyelesaikan Program Studi Kedokteran Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang.
6. dr.Triwahju Astuti, M.Kes, Sp.P(K), selaku ketua Program Studi Pendidikan Dokter Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya yang telah memberikan kesempatan menuntut ilmu dan dorongan kepada saya untuk menyelesaikan program pendidikan dokter.
7. Analis Laboratorium Biokimia Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya (FKUB) Malang yang telah memberikan bantuan selama penelitian untuk menyelesaikan penulisan tugas akhir ini.
8. Ibu Ferrida dan Mas Memet selaku bagian laboratorium Farmakologi FKUB Malang yang selalu membantu penulis selama penelitian berlangsung.
9. Pihak Laboratorium Patologi Anatomi FKUB Malang
10. Tim Tugas Akhir Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang yang membantu dalam penyelesaian tugas akhir dalam urusan administrasi sehingga penulis dapat melaksanakan Tugas Akhir dengan lancar.
11. Keluarga tercinta, Bapak, Ibu, dan kedua adik saya yang senantiasa memberikan fasilitas, motivasi, semangat, dan kasih sayang yang begitu besar sehingga penulis dapat menyelesaikan studi di Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang.

12. Teman dekat penulis Azki, Muthia, Intan, Faizna, Huda dan Abdul yang senantiasa memberikan semangat dan tempat berdiskusi dalam proses pembuatan tugas akhir
13. Teman-teman Medical Division angkatan 2015 serta kolegium Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang atas kekompakan dan kekeluargaan yang diberikan selama penulis menempuh studi di Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang.
14. Rekan tim penelitian pohon, Zuke, Kartika, Zalfa, dan kawan-kawan yang saling membantu dalam proses penelitian serta menyemangati satu sama lain.
15. Teman-teman sekolah penulis, Tata, Debby, Tika, Rara, Rima, Citra yang selalu memberi motivasi dan menyemangati penulis untuk menyelesaikan tugas akhir.
16. Semua pihak yang berperan serta dalam penyelesaian tugas akhir saya, sehingga saya dapat meraih gelar sarjana kedokteran.

Penulis menyadari masih terdapat kekurangan dalam penyusunan tugas akhir ini, saran dan dukungan sangat diharapkan dalam penyempurnaan penulisan ini, dan tidak mengurangi tujuan awal dari penulisan tugas akhir ini untuk bermanfaat bagi yang membutuhkan.

Malang, Maret 2019

Penulis

Florecentia Candra Mustika

ABSTRAK

Mustika, Florecentia Candra. 2019. **Hubungan Antara Ekspresi Kolagen-1 Jaringan Hati terhadap Derajat Fibrosis Hati pada Tikus Model Fibrosis Hati**. Tugas Akhir, Program Studi Pendidikan Dokter, Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Pembimbing: (1) dr. Supriono Sp. PD-KGEH (2) dr. Satrio Wibowo, Sp. A(K), M.Si,Med.

Penentuan fibrosis hati dengan biopsi hati masih merupakan standar baku dalam menentukan tahapan proses menuju sirosis hati. Salah satu metode untuk mengukur derajat keparahannya yaitu dengan skor Metavir. Ekspresi kolagen-1 diduga dapat digunakan sebagai marker untuk mengetahui ada tidaknya fibrosis hati mengingat bahwa kolagen-1 juga penyusun *Extracellular Matrix* pada fibrosis hati. Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui hubungan ekspresi kolagen-1 jaringan hati terhadap fibrosis hati pada tikus model fibrosis hati. Desain penelitian merupakan eksperimental laboratoris. Penelitian ini merupakan bentuk eksperimental in vivo pada hewan coba tikus *Rattus norvegicus* dari penelitian pohon tentang manfaat ekstrak *Moringa oleifera* terhadap fibrosis hati. Ekspresi kolagen-1 diketahui dengan menggunakan metode imunohistokimia dan fibrosis hati diketahui dengan pengecatan histopatologi. Analisis data menggunakan uji One-way ANOVA, uji post hoc LSD untuk membandingkan ekspresi kolagen-1 masing-masing kelompok sesuai derajat fibrosis skor Metavir untuk menunjukkan perbedaan tiap kelompok. Analisis data juga dilakukan untuk membandingkan luas fibrosis hati tiap kelompok fibrosis menggunakan uji Kruskal-Wallis dan uji post hoc Mann-Whitney. Uji korelasi Spearman menunjukkan hubungan signifikan ($p=0,000$) serta korelasi positif dan kuat ($R= 0,756$) antara ekspresi kolagen-1 dengan luas fibrosis yang dibandingkan pada setiap tikus.

Kata kunci: Fibrosis hati; Derajat; Kolagen-1; Marker; skor Metavir; Luas Fibrosis.

ABSTRACT

Mustika, Florecentia Candra. 2019. **Correlation Between Type-I Collagen of Liver Tissue and Liver Fibrosis Stage in Liver Fibrotic Rats**. Final Assignment, Medical Program, Faculty of Medicine, Brawijaya University. Supervisors: (1) dr. Supriono Sp. PD-KGEH (2) dr. Satrio Wibowo, Sp. A(K), M.Si,Med.

Liver fibrosis can be detected by liver biopsy as a gold-standard until nowadays. The theory of using Metavir score is known to detect liver fibrosis severity. Moreover, type-I collagen can be used to detect liver fibrosis as we know that type collagen is part of Extracellular Membrane contributing liver fibrosis. Aim of the experimental is to find out the correlation between type-I collagen expression on liver tissue and liver fibrosis in liver fibrotic rats. This research is in-vivo laboratory experimental in collaborative research using *Rattus novergicus* rats as object. The main goal of collaborative research is to find out *Moringa oleifera* effect in liver fibrosis-rats. Type-I collagen detection using immunohistochemistry staining while liver fibrosis detection using histopathology staining. Data analysis using One-way ANOVA test and LSD post hoc test to compare type-I collagen expression from each group based on Metavir score. Meanwhile data analysis using Kruskal-Wallis test and Mann-Whitney post hoc test to compare fibrotic area from each group. Spearman's key test showed a significant relationship ($p=0,000$) also positive-strong correlation between type-I collagen and fibrotic area ($R=0,756$) compared each mouse.

Keywords: Liver Fibrosis; Stage;Type-I collagen; Marker; Metavir score; Fibrotic area.

DAFTAR ISI

	Halaman
Halaman Judul.....	I
Halaman Pengesahan.....	ii
Pernyataan Keaslian Tulisan.....	iii
Kata Pengantar.....	iv
Abstrak.....	vii
Abstract.....	viii
Daftar Isi.....	ix
Daftar Tabel.....	xii
Daftar Gambar.....	xiii
Daftar Lampiran.....	xiv
Daftar Singkatan.....	xv
BAB 1 PENDAHULUAN	
1.1 Latar Belakang Masalah.....	1
1.2 Rumusan Masalah.....	3
1.3 Tujuan.....	3
1.3.1 Tujuan Umum.....	3
1.3.2 Tujuan Khusus.....	4
1.4 Manfaat.....	4
1.4.2 Manfaat Akademis.....	4
1.4.3 Manfaat Praktis.....	4
BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA	
2.1 Fibrosis Hati.....	5
2.1.1 Definisi.....	5
2.1.2 Etiologi.....	6
2.1.3 Patogenesis.....	7
2.1.4 Penentuan Derajat Fibrosis Hati.....	10
2.2 Kolagen-1.....	13
2.2.1 Definisi.....	13
2.2.2 Peran Kolagen-1 dalam Fibrosis Hati.....	15
2.2.3 Peran Kolagen-1 pada a-HSC.....	17

BAB 3 KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS PENELITIAN	
3.1 Kerangka Konsep.....	19
3.2 Hipotesis.....	20
BAB 4 METODE PENELITIAN	
4.1 Rancangan Penelitian.....	21
4.2 Tempat dan Waktu Penelitian.....	22
4.3 Populasi dan Sampel.....	23
4.3.1 Sampel Penelitian.....	23
4.3.2 Estimasi Jumlah Sampel.....	23
4.4 Variabel Penelitian.....	24
4.4.1 Variabel Bebas.....	24
4.4.2 Variabel Tergantung.....	24
4.5 Definisi Operasional.....	24
4.6 Alat dan Bahan Penelitian.....	26
4.6.1 Alat.....	26
4.6.2 Bahan.....	26
4.7 Prosedur Penelitian dan Pengumpulan Data.....	27
4.7.1 Ekstraksi <i>Moringa oleifera</i>	27
4.7.2 Pembuatan CCl ₄	28
4.7.3 Pemeliharaan dan Perlakuan pada Tikus	28
4.7.4 Pembedahan dan Pengambilan Organ.....	32
4.7.5 Pembuatan Preparat Histologi Jaringan Hati.....	33
4.7.6 Pemeriksaan Patologi Anatomi Jaringan Hati Tikus Model Fibrosis.....	34
4.7.7 Penghitungan Ekspresi Kolagen-1 Jaringan Hati Tikus Model Fibrosis Hati.....	35
4.8 Pengolahan Data.....	37
4.8.1 Uji Analisis.....	37
4.9 Alur Penelitian.....	39
BAB 5 HASIL DAN ANALISIS PENELITIAN	
5.1 Hasil Penelitian.....	40
5.2 Analisis Data.....	44

5.2.1 Uji Normalitas.....	45
5.2.2 Uji Homogenitas.....	46
5.2.3 Uji Perbedaan Ekspresi Kolagen-1 menggunakan <i>One Way Anova</i>	47
5.2.4 Uji Perbedaan Luas Fibrosis menggunakan <i>Kruskall-Wallis</i> ...	48
5.2.5 Uji independent T-test K-Negatif dan K-Positif.....	49
5.2.6 Uji Korelasi <i>Spearman</i>	49
BAB 6 PEMBAHASAN	
6.1 Pembahasan penelitian.....	51
6.2 Keterbatasan penelitian.....	54
BAB 7 KESIMPULAN DAN SARAN	
7.1 Kesimpulan.....	55
7.2 Saran.....	55
DAFTAR PUSTAKA	56
LAMPIRAN	63

DAFTAR TABEL

	Halaman
Tabel 5.1 Kelompok Tikus Berdasarkan Derajat Fibrosis.....	40
Tabel 5.2 Kelompok Tikus Model Fibrosis K-Positif dan K-Negatif.....	42
Tabel 5.3 Resume Output <i>Post Hoc</i>	45
Tabel 5.4 Resume <i>Output Mann-Whitney</i>	46

DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 2.1 Fibrosis Hati.....	5
Gambar 2.2 Patogenesis Fibrosis Hati.....	9
Gambar 2.3 Perbedaan pembagian kategori derajat fibrosis.....	11
Gambar 2.4 Pengukuran Derajat Fibrosis berdasarkan skor Metavir.....	12
Gambar 2.5 Pengaruh Keseimbangan ECM pada Fibrosis.....	16
Gambar 5.1 Gambar grafik tentang ekspresi Kolagen-1 masing-masing kelompok berdasarkan skor Metavir.....	41
Gambar 5.2 Grafik Rerata Ekspresi Kolagen-1 pada K-Positif dan K-Negatif.....	42
Gambar 5.3 Grafik Rerata Luas Fibrosis masing-masing kelompok berdasarkan skor Metavir.....	43
Gambar 5.2 Grafik scatter plot Luas Fibrosis dengan ekspresi Kolagen-1.....	44

DAFTAR LAMPIRAN

		Halaman
Lampiran 1	Tabel Data Berat Badan Tikus, Derajat Fibrosis, Luas Fibrosis dan Ekspresi Kolagen-1 Tiap Kelompok Perlakuan.....	63
Lampiran 2	Data perhitungan statistik dengan SPSS.....	64
Lampiran 3	Dokumentasi Penelitian.....	72
Lampiran 4	Gambar Hasil Pembacaan Fibrosis Hati.....	74
Lampiran 5	Etik.....	77

DAFTAR SINGKATAN

CCl₄: Karbon tetraklorida

HSC: *Hepatic Stellate Cell*

IGF: *Insulin-like growth factor*

IL: Interleukin ROS: *Reactive Oxygen Species*

MMP-2: *Metalloproteinase-2*

MO: *Moringa oleifera*

NO: *Nitric oxide*

NFLD: *Non-alcoholic Fatty Liver Disease*

PCIP: *Procollagen type I carboxy terminal peptide*

PIIINP: *Procollagen type III amino-terminal peptide*

TGF: *Transforming growth factor*

TIMP-1: *Tissue inhibitors of matrix metalloproteinase-1*

TNF: *Tumor necrosis factor*

HALAMAN PENGESAHAN

TUGAS AKHIR

**HUBUNGAN ANTARA EKSPRESI KOLAGEN-1 JARINGAN HATI TERHADAP
DERAJAT FIBROSIS HATI PADA TIKUS MODEL FIBROSIS HATI**

Oleh:

Florecentia Candra Mustika

155070101111043

Telah diuji pada

Hari : Selasa

Tanggal : 9 April 2019

Dan dinyatakan lulus oleh:

Penguji-I

dr. Saptadi Yulianto, M.Kes. SpA(K)

NIP. 198009202012121003

Pembimbing-I/Penguji-II,

Pembimbing-II/Penguji-III,

dr. Supriono, Sp.PD-KGEH

NIP.196605171998031004

dr. Satrio Wibowo, M.Si.Med. Sp.A(K)

NIP. 197705062008011009

Mengetahui,

Ketua Program Studi Kedokteran

dr. Triwahju Astuti, M.Kes. Sp.P(K)

NIP: 196310221996012001

ABSTRAK

Mustika, Florecentia Candra. 2019. **Hubungan Antara Ekspresi Kolagen-1 Jaringan Hati terhadap Derajat Fibrosis Hati pada Tikus Model Fibrosis Hati**. Tugas Akhir, Program Studi Pendidikan Dokter, Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Pembimbing: (1) dr. Supriono Sp. PD-KGEH (2) dr. Satrio Wibowo, Sp. A(K), M.Si,Med.

Penentuan fibrosis hati dengan biopsi hati masih merupakan standar baku dalam menentukan tahapan proses menuju sirosis hati. Salah satu metode untuk mengukur derajat keparahannya yaitu dengan skor Metavir. Ekspresi kolagen-1 diduga dapat digunakan sebagai marker untuk mengetahui ada tidaknya fibrosis hati mengingat bahwa kolagen-1 juga penyusun *Extracellular Matrix* pada fibrosis hati. Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui hubungan ekspresi kolagen-1 jaringan hati terhadap fibrosis hati pada tikus model fibrosis hati. Desain penelitian merupakan eksperimental laboratoris. Penelitian ini merupakan bentuk eksperimental in vivo pada hewan coba tikus *Rattus norvegicus* dari penelitian pohon tentang manfaat ekstrak *Moringa oleifera* terhadap fibrosis hati. Ekspresi kolagen-1 diketahui dengan menggunakan metode imunohistokimia dan fibrosis hati diketahui dengan pengecatan histopatologi. Analisis data menggunakan uji One-way ANOVA, uji post hoc LSD untuk membandingkan ekspresi kolagen-1 masing-masing kelompok sesuai derajat fibrosis skor Metavir untuk menunjukkan perbedaan tiap kelompok. Analisis data juga dilakukan untuk membandingkan luas fibrosis hati tiap kelompok fibrosis menggunakan uji Kruskal-Wallis dan uji post hoc Mann-Whitney. Uji korelasi Spearman menunjukkan hubungan signifikan ($p=0,000$) serta korelasi positif dan kuat ($R=0,756$) antara ekspresi kolagen-1 dengan luas fibrosis yang dibandingkan pada setiap tikus.

Kata kunci: Fibrosis hati; Derajat; Kolagen-1; Marker; skor Metavir; Luas Fibrosis.

ABSTRACT

Mustika, Florecentia Candra. 2019. **Correlation Between Type-I Collagen of Liver Tissue and Liver Fibrosis Stage in Liver Fibrotic Rats**. Final Assignment, Medical Program, Faculty of Medicine, Brawijaya University. Supervisors: (1) dr. Supriono Sp. PD-KGEH (2) dr. Satrio Wibowo, Sp. A(K), M.Si,Med.

Liver fibrosis can be detected by liver biopsy as a gold-standard until nowadays. The theory of using Metavir score is known to detect liver fibrosis severity. Moreover, type-I collagen can be used to detect liver fibrosis as we know that type collagen is part of Extracellular Membrane contributing liver fibrosis. Aim of the experimental is to find out the correlation between type-I collagen expression on liver tissue and liver fibrosis in liver fibrotic rats. This research is in-vivo laboratory experimental in collaborative research using *Rattus novergicus* rats as object. The main goal of collaborative research is to find out *Moringa oleifera* effect in liver fibrosis-rats. Type-I collagen detection using immunohistochemistry staining while liver fibrosis detection using histopathology staining. Data analysis using One-way ANOVA test and LSD post hoc test to compare type-I collagen expression from each group based on Metavir score. Meanwhile data analysis using Kruskal-Wallis test and Mann-Whitney post hoc test to compare fibrotic area from each group. Spearman's key test showed a significant relationship ($p=0,000$) also positive-strong correlation between type-I collagen and fibrotic area ($R=0,756$) compared each mouse.

Keywords: Liver Fibrosis; Stage;Type-I collagen; Marker; Metavir score; Fibrotic area.

BAB 1

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Fibrosis hati masih merupakan salah satu penyakit yang menjadi permasalahan kesehatan di berbagai belahan dunia. Proses dari fibrosis hati akan berlanjut menjadi sirosis hati ketika perbaikan jaringan bersifat patologis akibat kerusakan hati yang kronis (Duval *et. al.*, 2014). Menurut penelitian, sekitar 2% kematian terjadi karena fibrosis hati yang berkembang menjadi sirosis pada tahun 1980- 2010 (Mokdad *et al.*, 2014). Sebanyak 80 juta orang di asia pasifik meninggal akibat hepatitis c kronis yang berkembang menjadi sirosis hati (CEVHAP, 2012). karena itu penyakit ini terus menjadi perhatian serius di dunia kesehatan. (Duval *et. al.*, 2014)

Penelitian tentang fibrosis hati menjadi minat dalam bidang kesehatan mengingat fibrosis tidak menampilkan tanda dan gejala secara klinis. Beberapa penelitian menilai suatu keadaan fibrosis terhadap biomarker *non-invasive* (serum, *imaging*, *genomic*) maupun *invasive* (biopsi hati dan gradien tekanan vena hepatic) (Suk, *et al.*, 2013). Biopsi hati merupakan cara yang dianggap *gold-standard* dalam penentuan fibrosis hati. Pengukuran keparahan fibrosis paling banyak dengan dilakukan penghitungan skor derajat fibrosis, salah satunya skor metavir (Goodman, 2007) . Namun karena penghitungan skor berupa semiquantitative maka jumlah pasti dari derajat keparahannya masih mengandung subjektivitas dari penentu skor tersebut. Sehingga dibutuhkan marker lain dalam membantuk menentukan derajat keparahan proses fibrosis hati selain diagnosis nya. Beberapa biomarker *direct* yang dapat dilihat yaitu TIMP-1 (*Tissue inhibitors of matrix*

metalloproteinase-1), TGF- β 1 (*Transforming growth factor β 1*), MMP-2 (*Metalloproteinase-2*), PCIP (*Procollagen type I carboxy terminal peptide*), PIIINP (*Procollagen type III amino-terminal peptide*). PCIP dan PIIINP berkaitan dengan pembentukan kolagen yang berperan pada fibrosis hati. Kolagen yang paling banyak dihasilkan pada fibrogenesis yaitu kolagen-1 yang dapat meningkat hingga 8 kali. (Baranova, *et al.*, 2011)

Proses terjadinya fibrosis merupakan hasil reaksi inflamasi kronik akibat infeksi yang menetap, reaksi autoimun, respon alergi, paparan bahan kimia, radiasi dan perlukaan atau jejas hati (Wynn, 2008). Fibrosis hati merupakan respon penyembuhan luka yang *reversible* dari perlukaan hati dengan adanya penumpukan ECM (Hernandez-Gea dan Friedman, 2017). Penumpukan ECM yang tidak terkontrol dikarenakan adanya injuri atau perlukaan menetap yang mengakibatkan ketidakseimbangan produksi ECM (Arriazu, *et al.*, 2013). Penyebab perlukaan berupa stimulus yang berasal dari luar secara berkelanjutan sehingga terjadi inflamasi. Beberapa stimulus eksogen pemicu fibrosis hati antara lain Infeksi virus, bahan kimia, riwayat *Nonalcoholic Steatohepatitis* (NASH). (Ayala, 2014)

Jejas pada hati dapat mengundang sel-sel inflamasi seperti Sel Kupffer untuk membersihkan debris sel, sel-sel yang mengalami nekrosis serta membunuh dan memakan patogen penyebab jejas (Jaeschke, 2000). Sel Kupffer yang teraktivasi dalam proses inflamasi mengeluarkan sitokin IL-6, TGF- β 1, TNF- α , IGF dan *Reactive Oxygene Species* (ROS) yang dapat mengaktivasi *Quiescent Hepatic Stellate Cell* (q-HSC) / Sel Stelata Hati yang tenang. Aktivasi dari Sel HSC Hati juga dipengaruhi oleh sel-sel jaringan

parenkim hati di sekitarnya seperti hepatosit dan leukosit. (Liu *et al.*, 2012; Fujita dan Narumiya, 2016)

Sel HSC yang teraktivasi menunjang peran utama dalam proses fibrogenesis. HSC aktif bermigrasi dan akumulasi di jaringan yang membutuhkan perbaikan sebagai penghasil ECM utama. a-HSC kemudian mengalami transdiferensiasi menjadi sel seperti myofibroblas yang menyintesis kolagen (Bataller and Brenner, 2005). Sel hati juga berpotensi fibrogenik dengan menghasilkan kolagen. Deposit kolagen kemudian akan berlanjut menjadi fibrosis. Selain menghasilkan kolagen, sel HSC yang teraktivasi juga mengekspresikan metalloproteinase untuk mencegah apoptosis dan mempertahankan sel HSC itu sendiri. (Birukawa *et al.*, 2014).

Perlukaan / jejas yang kronik yang dihentikan akan mengurangi a-HSC dalam mengekspresikan metalloproteinase. Ekspresi metalloproteinase yang menurun menyebabkan a-HSC mudah apoptosis dan produksi kolagen berkurang sehingga fibrosis pun dapat berkurang (Birukawa *et al.*, 2014). Namun dalam penelitian terbaru belum jelas hubungan ekspresi kolagen pada kejadian fibrosis. Oleh karena itu, dilakukan penelitian untuk membuktikan hubungan kolagen terhadap fibrosis hati.

1.2 Rumusan Masalah

Apakah terdapat hubungan antara ekspresi kolagen-1 jaringan hati terhadap derajat fibrosis hati pada tikus model fibrosis hati?

1.3 Tujuan Penelitian

1.3.1 Tujuan Penelitian Umum

Membuktikan adanya hubungan antara ekspresi kolagen-1 jaringan hati terhadap fibrosis hati pada tikus model fibrosis hati.

1.3.2 Tujuan Penelitian Khusus

1. Mengukur derajat dan menghitung luas fibrosis hati
2. Menghitung ekspresi kolagen-1 jaringan hati tikus semua kelompok
3. Membandingkan ekspresi kolagen-1 jaringan hati tikus antar kelompok
4. Menghitung korelasi ekspresi kolagen-1 jaringan hati tikus dengan luas fibrosis hati tikus model fibrosis hati

1.4 Manfaat Penelitian

1.4.1 Manfaat Akademik

1. Menambah wawasan tentang hubungan ekspresi kolagen-1 jaringan hati terhadap derajat fibrosis hati pada tikus model fibrosis hati
2. Memberikan kontribusi positif pada dunia medis tentang fibrosis hati
3. Menambah referensi bacaan ilmiah yang dapat dijadikan alternatif landasan penelitian atau karya tulis ilmiah berikutnya terkait fibrosis hati

1.4.2 Manfaat Praktis

1. Mengetahui hubungan ekspresi kolagen-1 jaringan hati terhadap derajat fibrosis hati pada tikus model fibrosis hati
2. Menambahkan ekspresi kolagen-1 sebagai marker diagnostik dalam mengetahui keparahan fibrosis hati yang terjadi

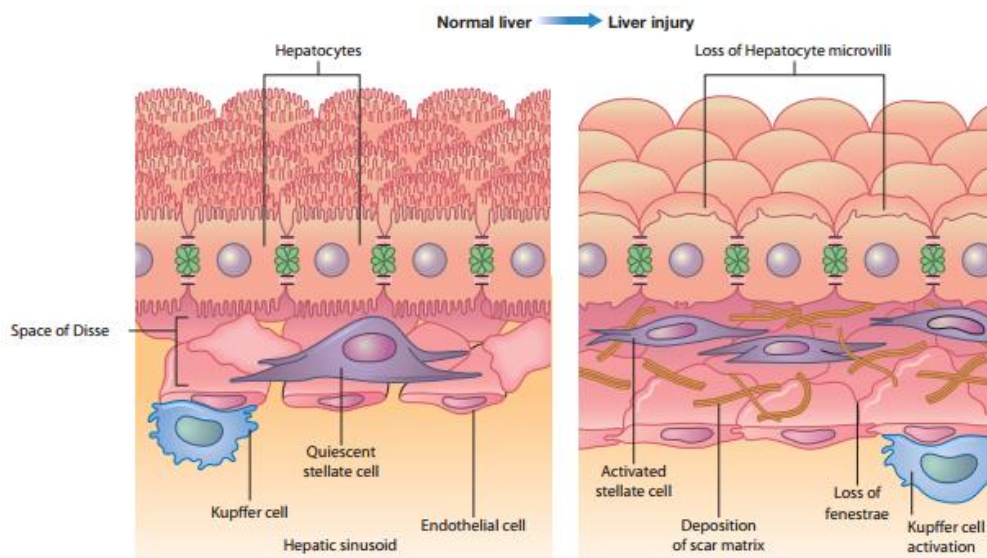
BAB 2

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Fibrosis hati

2.1.1 Definisi

Fibrosis dapat didefinisikan sebagai deposisi yang berlebihan dari komponen matriks ekstraseluler (ECM) termasuk salah satunya kolagen (Wynn, 2008). Proses terjadinya fibrosis merupakan hasil reaksi inflamasi kronik akibat infeksi yang menetap, reaksi autoimun, respon alergi, paparan bahan kimia, radiasi dan perlukaan atau jejas hati. Fibrosis hati merupakan respon penyembuhan luka yang *reversible* dari perlukaan hati dengan adanya penumpukan ECM (Hernandez-Gea dan Friedman, 2017).



Gambar 2.1 Fibrosis Hati

Deposisi ECM atau *scar matrix* terdapat di *Disse* pada jaringan hati yang mengalami jejas atau injuri (Boyer, *et al.*, 2012)

Penumpukan ECM yang tidak terkontrol dikarenakan adanya injuri atau perlukaan menetap yang mengakibatkan ketidakseimbangan produksi ECM (Arriazu, *et al.*, 2013). Penyebab perlukaan berupa stimulus yang berasal dari luar secara berkelanjutan sehingga terjadi inflamasi. Beberapa stimulus eksogen pemicu fibrosis hati antara lain Infeksi virus, bahan kimia, riwayat *Nonalcoholic Steatohepatitis* (NASH). (Ayala *et al.*, 2014)

2.1.2 Etiologi

Hepatitis akibat infeksi virus hepatitis masih banyak terjadi di Indonesia. Menurut Riskesdas tahun 2013, prevalensi hepatitis akibat virus 1,2 kali lebih tinggi daripada tahun 2007 dan jenis hepatitis yang banyak menginfeksi adalah virus hepatitis B. HBV atau Virus hepatitis B adalah virus DNA *double-stranded* dengan transmisi secara parenteral. HBV dapat dikatakan sebagai *silent killer* karena masih sulitnya terdeteksi sebelum terjadinya komplikasi akibat infeksi kronis dan tidak adanya pengobatan sebelum komplikasi itu terjadi (Blachier *et al.*, 2013).

Konsumsi alkohol merupakan bahan kimia yang masih sering menjadi penyebab fibrosis hati di dunia karena penyalahgunaan dari alkohol. Alkohol yang dikonsumsi akan dimetabolisme di hati yang dapat menginduksi produksi ROS, peroksidasi lipid, dan sintesis kolagen. Hal tersebut dapat memicu terjadinya apoptosis hati akibat inflamasi yang mengaktifasi HSC sehingga berkembang menjadi fibrosis hati pada konsumsi alkohol jangka panjang/penyalahgunaan (Yanguas *et al.*, 2015).

Bahan kimia lain yang dapat menginduksi adanya fibrosis hati adalah karbon tetraklorida (CCl_4). Pada karbon tetraklorida sering digunakan dalam penelitian tikus model fibrosis karena metabolismenya pada tikus yang tinggi dapat mengaktifasi sel Kupfer sehingga terjadi inflamasi pada hati yang dapat berkembang menjadi fibrosis hati (Yanguas *et al.*, 2015).

Penyebab selain adanya paparan infeksi dan bahan kimia yaitu karena adanya riwayat *Nonalcoholic Steatohepatitis* (NASH). Lipotoksisitas yang ditandai dengan penumpukan asam lemak bebas (*Free Fatty Acid*) yang berlebihan pada hati merupakan awal dari terjadinya NASH. Konsumsi asam lemak bebas yang tinggi menyebabkan pembentukan metabolit lemak beracun karena penyimpanan lemak yang berlebihan sehingga memicu produksi ROS yang berlebihan. Reaksi oksidatif yang berlebihan menyebabkan jejas hati dan dapat berkembang menjadi fibrosis hati. (Magee *et al.*, 2016)

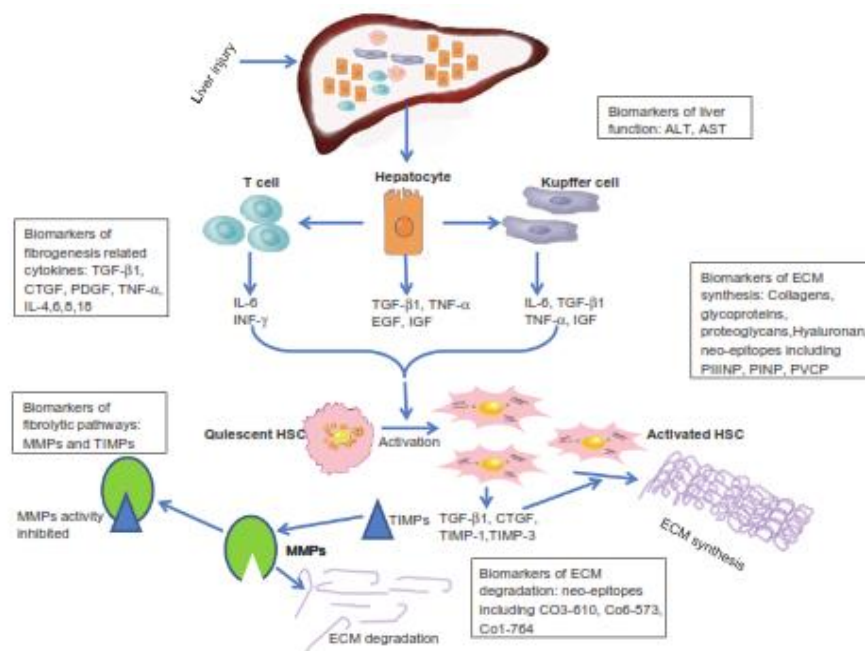
2.1.3 Patogenensis

Fibrosis hati terjadi karena adanya proses yang kompleks akibat jejas hati. Setelah terjadi jejas hati terdapat proses perbaikan yang berbeda yaitu melalui jalur regenerasi dan jalur fibrosis. Pada jalur regenerasi, hepatosit yang mengalami jejas akan digantikan dengan tipe sel yang sama. Berbeda dengan jalur regenerasi, jalur fibrosis terjadi akibat jejas yang berkelanjutan dan tidak terkontrol sehingga jaringan parenkim yang seharusnya diganti dengan jenis sel yang sama digantikan dengan jaringan ikat padat yang berasal dari *Extracellular Matrix* (ECM). (Liu *et al.*, 2012)

Jejas yang terjadi dapat mengundang sel-sel inflamasi seperti Sel Kupffer untuk membersihkan debris sel, sel-sel yang mengalami nekrosis serta membunuh dan memakan patogen penyebab jejas (Jaeschke, 2000). Sel Kupffer yang teraktivasi dalam proses inflamasi mengeluarkan sitokin IL-6, TGF- β 1, TNF- α , IGF dan *Reactive Oxygene Species* (ROS) (Liu *et al.*, 2012; Fujita dan Narumiya, 2016). Sel Kupffer yang bertugas untuk membunuh sel patogen dengan menghasilkan ROS (*Reactive Oxygene Species*) seperti superoxide, hydrogen peroxide dan hypochlorous acid serta elastase dan cathepsi G (Jaeschke, 2000). ROS yang dihasilkan juga menyebabkan injuri hepatosit dengan merusak DNA dan terjadi apoptosis hepatosit serta ekspresi gen-gen pro inflamasi yang memulai proses fibrogenesis (Pinzani, 2015). Dengan adanya *inducible Nitric Oxide*, hepatosit menjadi toksik dengan peningkatan NO (*Nitric oxide*) dan NFKb (*kappa-light-chain enhancer of activated B cells*) faktor nukleus sehingga sel juga dapat mengalami reaksi stress oksidasi dan pembentukan ROS (Czaja, 2014).

Interaksi dari sel-sel inflamasi dan sitokin-sitokin pro inflamasi berdampak pada aktivasi HSC, salah satunya dengan adanya ROS yang dihasilkan oleh sel Kupffer dan hepatosit. Menurut penelitian Pinzani (2015), kerusakan hepatosit dan aktivasi sel-sel inflamasi berdampak pada aktivitas myofibroblas dengan cara *upregulation* dari gen profibrogenik termasuk *procollagen* tipe 1, *Monocyte Chemoattractant Protein-1* (MCP-1) dan *Tissue Inhibitor of Metalloproteinase-1* (TIMP1). Selain itu, NADPH (Nicotinamide adenine

dinucleotide phosphate) oksidase pada sel-sel pro inflamasi (Neutrofil) dapat menginduksi pembentukan ROS pada α -HSC. Sel Stelata Hati (HSC) secara fisiologis berada di celah Disse hati yang menyintesis matriks ekstraseluler (ECM) dan degradasi matriks metalloproteinase. HSC yang teraktivasi (α -HSC) berubah mejadi myofibroblas yang fibrogenetik, proliferaatif, dan kontraktil melalui perubahan *lose lipid-rich granules* menjadi α -smooth muscle actin (α -SMA)-positive myofibroblas secara *transdifferentiate*. Perubahan yang terjadi menyebabkan produksi ECM, kolagen pembentuk fibrin, serta sitokin proinflamasi meningkat sehingga terjadi deposisi dan berkembang menjadi fibrosis hati. (Fujita dan Narumiya, 2016)



Gambar 2.2 Patogenesis Fibrosis Hati

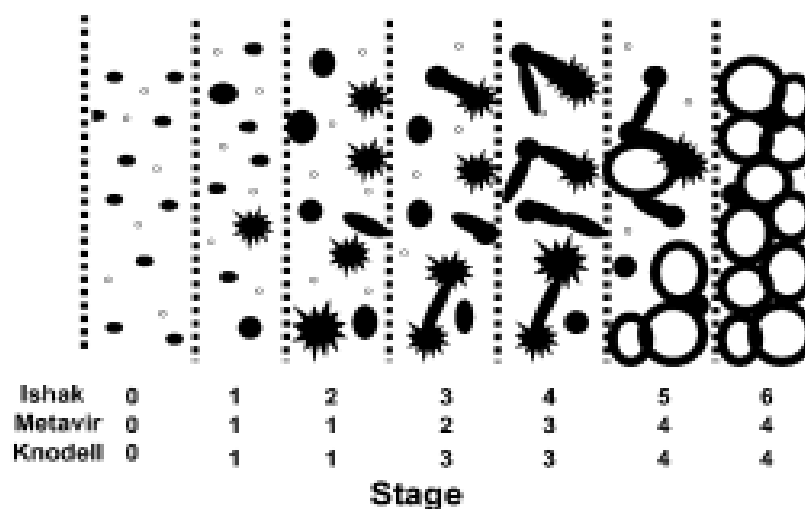
Jejas hati menyebabkan aktivasi sel T dan sel Kupffer dalam upaya perbaikan sel hati dengan memproduksi ECM melalui sitokin-sitokin dan sinyal lain yang berperan dalam aktivasi sel HSC sehingga terjadi fibrogenesis (Liu *et al.*, 2012)

2.1.4 Penentuan Derajat Fibrosis Hati

Penelitian tentang fibrosis hati menjadi minat dalam bidang kesehatan mengingat fibrosis tidak menampilkan tanda dan gejala secara klinis. Beberapa penelitian menilai suatu keadaan fibrosis terhadap biomarker *non-invasive* (serum, *imaging*, *genomic*) maupun *invasive* (biopsi hati dan gradien tekanan vena hepatic) (Suk, *et al.*, 2013). Beberapa biomarker *direct* yang dapat dilihat yaitu TIMP-1 (*Tissue inhibitors of matrix metalloproteinase-1*), TGF- β 1 (*Transforming growth factor β 1*), MMP-2 (*Metalloproteinase-2*), PCIP (*Procollagen type I carboxy terminal peptide*), PIIINP (*Procollagen type III amino-terminal peptide*) (Baranova, *et al.*, 2011). Dari beberapa contoh biomarker, biopsi hati merupakan cara yang masih dianggap *gold-standard* dalam penentuan fibrosis hati. (Suk, *et al.*, 2013)

Biopsi hati memiliki tujuan untuk mengetahui diagnosis penyakit hati pasien. Tujuan lain yang didapatkan yaitu dapat mengukur keparahan dan/atau progresifitas penyakit hati dengan menentukan derajat keparahannya (Goodman, 2007). Suatu penyakit perlu diukur derajat keparahannya untuk menilai sejauh apa perubahan yang terjadi dari bentuk normalnya. Derajat keparahan yang dapat ditentukan salah satunya derajat fibrosis dalam perjalanannya menjadi sirosis. Namun, dalam biopsi hati untuk mengetahui derajat keparahan butuh keakuratan dalam mewakili sampel (Suk *et al.*, 2013). Hal ini tidak dipungkiri terjadi kesalahan mengingat bahwa biopsi hati hanya mewakili 1/50.000 bagian dan fibrosis hati yang terjadi juga tersebar tidak merata. (Goodman, 2007)

Pengukuran derajat fibrosis dengan biopsi hati memiliki beberapa metode antara lain skor Metavir, skor Ishak, dan skor Knodell (Goodman, 2007). Metode paling sederhana adalah penggunaan skor Knodell. Peneliti bernama Knodell mengklasifikasi kan perjalanan fibrosis menjadi tiga yaitu *mild*, *moderate*, *severe*. Kemudian oleh peneliti Ishak mengembangkan skor Knodell yang sudah ada menjadi tujuh kategori yaitu tingkat fibrosis 0 hingga fibrosis 6. Pada masing-masing kategori menggambarkan perkembangan serta letak fibrosis. Sedangkan pada skor metavir membagi kategori menjadi lima tahap. (Goodman, 2007)



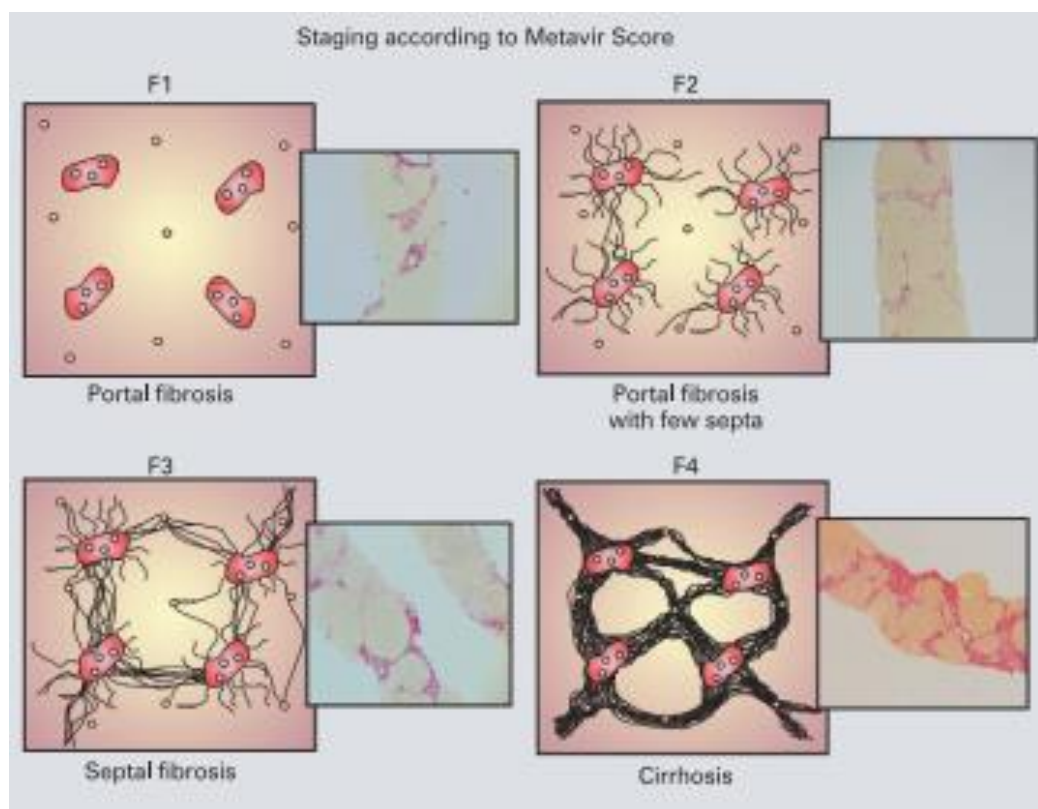
Gambar 2.3 Perbedaan pembagian kategori derajat fibrosis

Perbandingan antara tujuh tahap fibrosis skor Ishak (0-6) dengan lima tahap fibrosis skor Metavir dan tiga tahap fibrosis skor Knodell. Jaringan hati yang normal (tahap 0) memiliki jaringan fibros yang sedikit di daerah porta (lingkaran hitam) dan dinding dari vena sentra (lingkaran terbuka). Hepatitis kronik menampakkan perluasan jaringan fibrosa di jalur porta yang dapat berkembang menjadi septum pendek yang menajam di masing-masing tepi yang melibatkan beberapa saluran porta (tahap 1) kemudian berlanjut mengenai seluruh saluran porta (tahap 2). Dengan perkembangan penyakit, septum fibrosa berkembang menjadi jembatan diantara beberapa struktur vaskular, antar porta dan antara porta ke sentra (tahap 3) kemudian berlanjut mejadi septum atau jembatan yag lebih banyak (tahap 4). Ketika beberapa area menjaga bentuk lobular, nodul-nodul parenkim mulai dikelilingi jaringan fibrosis (tahap 5), dan ketika jaringan terbentuk dari nodul-nodul tersebut maka dapat terjadi suatu keadaan fibrosis. (Goodman, 2007)

Skor Metavir merupakan penilaian yang paling banyak digunakan pada penyakit hati kronis, salah satunya dalam infeksi Hepatitis C kronik

(Asselah *et al.*, 2015). Penggunaan skor Metavir hampir sama dengan skor Ishak hanya berbeda pada dua kategori terakhir (tahap 5-6) menjadi satu di tahap 4, yaitu keadaan sirosis hati. Pembagian tahap berdasarkan skor Metavir yaitu:

- F0: tidak ada fibrosis,
- F1: jaringan fibrosa daerah porta yang melebar,
- F2: jaringan fibrosa daerah porta dengan beberapa septum,
- F3: beberapa septum jaringan fibrosis melibatkan beberapa porta, merusak intralobular,
- F4: Sirosis hati.



Gambar 2.4 Pengukuran Derajat Fibrosis berdasarkan skor Metavir
 Tahapan Derajat Fibrosis menurut skor Metavir dari awal pembentukan jaringan fibrosa pada skor F1 hingga menjadi Sirosis Hati pada skor F4. (Asselah *et al.*, 2008)

2.2 Kolagen-1

2.2.1 Definisi

Kolagen merupakan protein pada jaringan ikat yang banyak diekspresi oleh semua organ dan jaringan baik itu dibutuhkan maupun tidak. Hingga saat ini, ada empat puluh dua gen yang mengode berbagai macam kolagen yang berbeda menjadi dua puluh delapan tipe kolagen yang sudah teridentifikasi (Karsdal *et al.*, 2017). Kolagen-kolagen ini diberi nama dengan nomer menggunakan angka Romawi (I-XXVIII). Kolagen adalah molekul trimerik yang terbentuk dari 3 ikatan alfa polipeptida yang terdiri dari urutan $(G-X-Y)_n$ yang berulang. Ikatan peptida yang berulang kemudian membentuk domain *triple helix* (COL) yang membentuk struktur berbeda sehingga terbentuk superfamili kolagen. (Ricard-Blum, 2011)

Selain perbedaan karena bentuk diantara dua puluh delapan superfamili kolagen, terdapat kolagen yang isoform dan *hybrid*. Kolagen dengan molekular yang isoform yaitu kolagen IV dan VI. Selain itu terdapat kolagen dengan *hybrid* isoform terdiri dari ikatan 2 kolagen yang berbeda yaitu kolagen V atau IX (Richard-Brum, 2011). Kolagen IX dapat berubah menjadi kolagen V dalam vitreous dan meningkat saat akhir pembentukan kartilago (Wu *et al.*, 2009). Kolagen yang berbeda struktur juga dikelompokkan ke subfamili yang terbagi menjadi:

1. Kolagen pembentuk fibrin (I, II, III,V, XI, XXVI, XXVII)
2. *Fibril-associated collagen* dengan heliks triplet yang terputus (FACITs). FACIT tidak membentuk fibrin dengan sendirinya melainkan dengan cara berhubungan dengan permukaan

kolagen pembentuk fibrin (IX, XII, XIV, XVI, XIX, XX, XXI, XXII, XXIV)

3. Kolagen pembentuk jala (*network*) (IV, VIII, X)
4. Kolagen penguat membran (XIII, XVII, XVIII, XXV)
5. Kolagen penghubung, mikrofibril (VI, VII, XV)
6. Kolagen pendek (developmental) (XXVI, XXVIII). (Karsdal *et al.*, 2017)

Proses pembentukan kolagen berawal dari propeptida pro-kolagen yang terpecah saat maturasi oleh beberapa protease. N-propeptida terpecah akibat *procollagen N-proteinase* milik famili *A Disintegrin and Metalloproteinase with Thrombospondin Motif* (ADAMTS), kecuali N-propeptida dari ikatan pro- α 1(V) (Karsdal *et al.*, 2017). Beberapa kolagen, salah satunya Kolagen I, disintesis di retikulum endoplasma sel dimana dua ikatan pro- α 1 dan pro- α 2 digabungkan membentuk kolagen. Proses yang kompleks ini diantarai oleh hidroksilasi dari prolin dan lisin untuk menstabilkan helix, disekresikan ke ruang ekstraseluler, pembuangan enzimatik dari propeptida N- dan C- tetrminal, mengemas bahan-bahan menjadi fibrin dan tahap akhir membentuk kolagen fibrin. Usia adalah salah satu pengaruh pada perbedaan pembentukan kolagen contohnya pada kolagen membrana basalis (kolagen IV) dan matriks intersisial (umumnya Kolagen I). Pada penelitian Karsdal *et al.* (2016), pergantian Kolagen I dan II seratus kali lebih tinggi pada tikus usia 1 bulan dibanding binatang dengan usia 6 bulan. (Karsdal *et al.*, 2016)

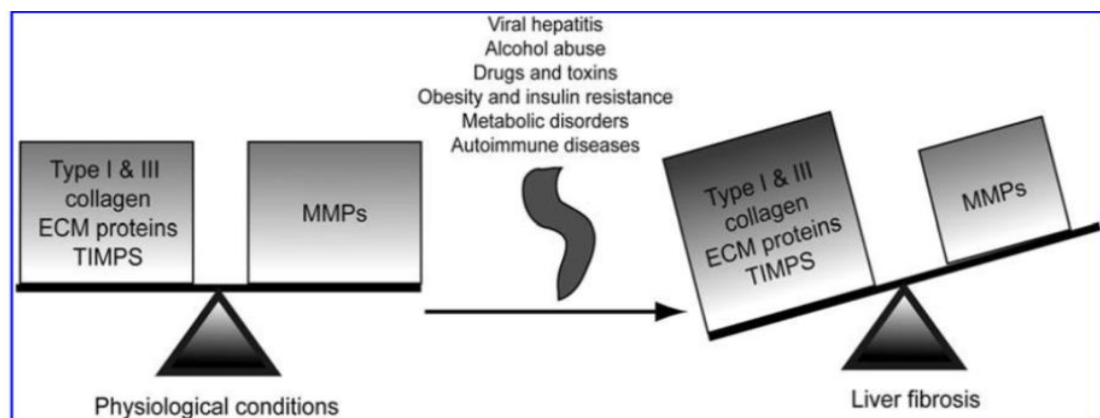
2.2.2 Peran Kolagen-1 dalam Patogenesis Fibrosis Hati

Kolagen dapat ditemukan di dua bagian yang berbeda yaitu terletak di membrana basalis dan matriks intersisial. Beberapa diantaranya terdapat di kedua tempat tersebut dan terkadang berperan untuk menghubungkan dua kompartmen tersebut. Kolagen I, III, dan V dominan dihasilkan oleh fibroblas yang berperan dalam struktur matriks intersisial. Kolagen memiliki spesialisasi dan lokasi yang bervariasi di membrane ekstraselular. Salah satu contohnya yaitu kolagen penghubung seperti Kolagen IV paling banyak ditemukan di lamina basalis, di bawah epitel atau endotel. Dalam hubungannya terkait fibrosis, penting mengetahui hal tersebut akibat penumpukan kolagen membrana basalis atau matriks kolagen intersisial yang terkadang tidak pada tempatnya. (Karsdal *et al.*, 2017)

Fibrosis hati terjadi akibat penumpukan matriks ekstraselular (ECM) yang berlebih. ECM secara normal mengisi jaringan atau organ untuk membantu menunjang sel-sel secara fisik mempertahankan kekuatan serta elastisitas jaringan dan organ. Selain itu, fungsi ECM juga membantu hidrasi dan homeostasis dari sel-sel yang berinteraksi. Komposisi ECM terdiri dari protein kolagenus dan non kolagenus. Protein kolagenus terbanyak yang dihasilkan yaitu Kolagen-1 sebagai kolagen *fibril-forming*. Tidak dipungkiri jika peningkatan deposisi ECM pada fibrogenesis maka ekspresi Kolagen-1 juga meningkat. (Fritz, 2008; Arriazu *et al.* 2013)

Sel HSC yang teraktivasi merupakan peran utama dalam proses fibrogenesis. HSC terdapat di celah *Disse* sebagai penyimpan vitamin A

utama pada hati keadaan normal. Pada injuri yang kronik, HSC teraktivasi atau berdiferensiasi menjadi sel mirip myofibroblas, mengundang sel-sel proinflamasi dan protein fibrogenik. α -HSC kemudian mengalami transdiferensiasi menjadi sel seperti myofibroblas yang menyintesis kolagen (Bataller and Brenner, 2005). Sel hepatosit juga berpotensi fibrogenik dengan menghasilkan kolagen. HSC yang teraktivasi bermigrasi kemudian berkumpul di jaringan yang membutuhkan perbaikan dan menghasilkan banyak ECM serta regulasinya, salah satunya yaitu menyintesis kolagen. Deposit kolagen kemudian akan berlanjut menjadi fibrosis. Selain menghasilkan kolagen, sel HSC yang teraktivasi juga mengekspresikan metalloproteinase, contohnya TIMP (*tissue inhibitor of metalloproteinase*) untuk mencegah apoptosis karena degradasi oleh MMP (*matrix metalloproteinase*) dalam mempertahankan sel HSC itu sendiri. (Birukawa *et al.*, 2014)



Gambar 2.5 Pengaruh Keseimbangan ECM pada Fibrosis

Dalam keadaan yang fisiologis, homeostasis ECM memerankan keseimbangan dari sintesis dan degradasi dari protein-protein ECM. Ketika mengalami kondisi buruk akibat penyakit, keseimbangannya terganggu sehingga komposisi ECM didominasi dengan deposisi fibrilar Kolagen-1 dan protein lain yang dapat mengubah hati menjadi bentuk patologis. MMP, *matrix metalloproteinase*; TIMP, *tissue inhibitor of metalloproteinase*. (Arriazu, *et al.*, 2013)

2.2.3 Peran Kolagen-1 dalam keberadaan a-HSC

Kolagen-1 merupakan protein yang paling banyak dalam tubuh manusia. Protein penyusunnya terdiri dari polipeptida dua $\alpha 1(I)$ dan $\alpha 2(I)$. Gen yang mengatur produksi dari Kolagen-1 paling banyak terdapat di dalam sel Stelata atau sel HSC (Fritz, 2008). Sel HSC yang teraktivasi juga mengespresikan banyak gen selain kolagen, yang dinamakan *homebox transcription factors* diantaranya Prx1 dan Prx2. Secara normal, gen Prx 1 terdapat pada proses embriologi untuk membentuk mesenkimal, tetapi ekspresi gen ini juga meningkat 10-25 kali pada fibrosis hati. Prx1 transaktivasi promotor kolagen $\alpha 1(I)$ kemudian ekspresi gen tersebut meningkat pada a-HSC. Peningkatan ekspresi gen Prx1 yang berlebih bisa memicu aktivasi gen lainnya sehingga ekspresi kolagen lain ikut muncul (Kolagen-3). Tidak heran jika Prx1 merupakan faktor yang mengawali transformasi fibrogenik dari HSC. Oleh karena itu, aktivasi dari sel HSC juga dapat meningkatkan ekspresi dari kolagen hingga 50-100 kali. (Fritz, 2008)

Penyakit hati pada manusia terjadi *down* regulasi dari MMP1 (kolagenase intersisial, kolagenase I) dan *up* regulasi dari MMP2 (gelatinase A) dan MMP9 (gelatinase B). Hal ini mengakibatkan meningkatnya degradasi dari kolagen membrana basalis. Terlebih dalam keadaan ini menyebabkan terjadinya penurunan degradasi dari kolagen intersisial sehingga ECM yang mengalami disposisi semakin meningkat. Aktivitas MMP juga diregulasi oleh TIMP sebagai inhibitor degradasi matriks. TIMP1 and TIMP2 mengalami *up* regulasi tergantung dari aktivitas MMP1. Secara kebalikan, selama proses resolusi injuri hati,

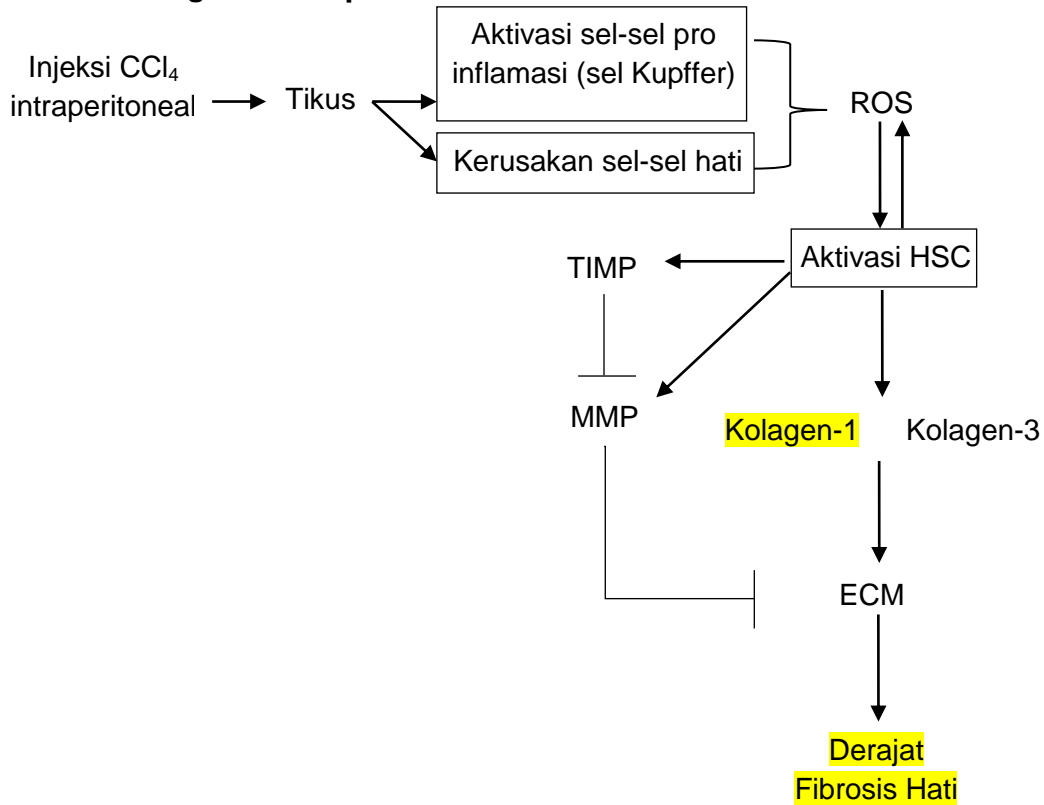
ekspresi TIMP-1 dan TIMP-2 berkurang sedangkan ekspresi kolagenase tidak berubah sehingga menjadi jaringan ikat fibrous yang terus bertambah. Sumber dari MMP2, TIMP-1 dan TIMP-2 yaitu sel HSC yang teraktivasi yang bekerja sama dengan sel Kupffer dalam memproduksi kolagen-4. (Boyer, *et al.*, 2012)

Saat proses fibrogenesis terjadi, HSC selain menghasilkan kolagen juga mengekspresikan MT1-MMP (*membrane type 1 metalloproteinase*). Walaupun terdapat MMP, a-HSC juga menyekresi TIMP sehingga aktivitas MMP tertekan dan deposisi kolagen melewati batas degradasi sehingga terjadi fibrosis. Sebaliknya, jika keadaan penyakit atau jejas kronik dihilangkan atau dihentikan, a-HSC akan memulai apoptosisnya dengan deaktivasi secara parsial dan kemudian terjadi resolusi secara spontan. Terlebih fungsi TIMP untuk mencegah apoptosis HSC dianggap berasal dari efek *metalloproteinase*. Mekanisme apoptosis HSC faktor utamanya adalah ekspresi TIMP yang menurun, mengingat TIMP-1 sebagai faktor utama HSC bertahan. Selain itu, peran kolagen dalam apoptosis HSC juga ditemukan dengan cara pemecahan N-cadherin seluler oleh MMP2. Karena belum terbukti dengan jelas, mekanisme yang menyebabkan HSC bertahan maupun apoptosis ada hubungannya dengan peran kolagen, TIMP, dan MMP masih dianggap kontroversial. (Birukawa *et al.*, 2014)

BAB 3

KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS PENELITIAN

3.1. Kerangka Konsep



Keterangan:

Kolagen-1 dan Fibrosis Hati : Faktor yang diteliti

HSC : *Hepatic Stellate Cell*

ECM : *Extracellular Matrix*

MCP-1 : *Monocyte Chemoattractant Protein-1*

TIMP-1 : *Tissue Inhibitor of Metallopeptidase-1*

Injuri atau jejas hati pada tikus bisa terjadi akibat induksi karbon tetraklorida (CCl₄) secara langsung maupun melalui ROS. Karbon tetraklorida dapat menyebabkan jejas pada hepatosit dengan kerusakan langsung pada DNA. Jejas pada sel hepatosit kemudian dapat memproduksi ROS sebagai bentuk

proteksi. Selain itu, ROS juga dihasilkan oleh sel-sel inflamasi yang berperan salah satunya sel Kupffer. Interaksi dari sel-sel inflamasi dan sitokin-sitokin pro inflamasi berdampak pada aktivasi HSC, salah satunya dengan adanya ROS yang dihasilkan oleh sel Kupffer dan hepatosit. Selain itu, NADPH (Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate) oksidase pada sel-sel pro inflamasi (Neutrofil) dapat menginduksi pembentukan ROS pada a-HSC. HSC yang teraktivasi menghasilkan metalloproteinase agar menyeimbangkan sintesis dan regulasinya. MMP yang dihasilkan bertujuan untuk mendegradasi ECM agar tercapai homeostasis. TIMP juga diekspresikan oleh sel HSC untuk meregulasi MMP serta mempertahankan sel HSC. Namun, dalam keadaan jejas kronis produksi TIMP mengalami *upregulasi* atau lebih besar sehingga aktivitas MMP tertekan dan degradasi kolagen intersisial menurun. Sel Stelata Hati (HSC) secara fisiologis berada di celah Disse hati yang menyintesis matriks ekstraseluler (ECM). Adanya ECM yang terus menumpuk akibat injuri yang persisten mengakibatkan terbentuknya fibrosis hati.

3.2. Hipotesis

Dari kerangka konsep di atas, maka hipotesis dari penelitian ini adalah terdapat hubungan antara ekspresi Kolagen-1 jaringan hati terhadap derajat fibrosis hati pada tikus model fibrosis hati.

BAB 4

METODE PENELITIAN

4.1 Rancangan Penelitian

Penelitian eksperimental dilaksanakan dalam bentuk *true experimental laboratory*. Penelitian ini termasuk eksperimental in vivo pada hewan coba tikus yang merupakan bagian dari penelitian pohon tentang manfaat ekstrak *Moringa oleifera* terhadap fibrosis hati. Metode yang digunakan adalah *randomized posttest only controlled group design* dengan hewan coba tikus yang akan dibuat model fibrosis hati. Beberapa tikus akan diinduksi oleh CCl₄ dan diberi perlakuan dengan diberikan ekstrak MO. Ekstrak MO yang digunakan berupa serbuk yang diperoleh dari Materia Medica Batu, Malang. Sebelum diberi perlakuan, hewan coba melewati proses adaptasi kandang terlebih dahulu selama 7 hari kemudian dibagi menjadi 5 kelompok secara acak, sebagai berikut :

1. Kelompok negatif (K-Neg): kelompok tikus diberi injeksi NaCl 1 cc/kgBB, 2x/minggu, intra-peritoneal (IP) selama 97 hari (\pm 14 minggu) dan diberi Aquades P.O dosis 2,5 mL sebagai placebo selama 97 hari. Tikus dikorbankan 48 jam setelah injeksi NaCl terakhir.
2. Kelompok positif (K-Pos): kelompok tikus diberi injeksi CCl₄ 10% IP, 1 cc/kgBB, 2x/minggu selama 97 hari, dan diberi Aquades P.O dosis 2,5 mL sebagai placebo selama 97 hari. Tikus dikorbankan 48 jam paska injeksi CCl₄ terakhir.
3. Kelompok perlakuan-1 (KP-1): kelompok tikus diberi injeksi CCl₄ 10% IP, 1 cc/kgBB, 2x/minggu selama 97 hari. MO dosis 150 mg/kgBB diberikan

P.O selama 97 hari. Tikus dikorbankan 48 jam setelah injeksi CCl_4 terakhir.

4. Kelompok perlakuan-2 (KP-2): kelompok tikus diberi injeksi CCl_4 10% IP, 1 cc/kgBB, 2x/minggu selama 97 hari. MO dosis 300 mg/kgBB diberikan P.O selama 97 hari. Tikus dikorbankan 48 jam setelah injeksi CCl_4 terakhir.
5. Kelompok perlakuan-3 (KP-3): kelompok tikus diberi injeksi CCl_4 10% IP, 1 cc/kgBB, 2x/minggu selama 97 hari. MO dosis 600 mg/kgBB diberikan P.O selama 97 hari. Tikus dikorbankan 48 jam setelah injeksi CCl_4 terakhir.

Tikus yang sudah dikelompokkan sesuai perlakuan memiliki respon yang berbeda terhadap derajat fibrosis. Oleh karena itu, peneliti mengelompokkan berdasarkan derajat fibrosis yang terbentuk menurut skor Metavir sebagai berikut:

1. Kelompok F0: tidak ada fibrosis,
2. Kelompok F1: jaringan fibrosa daerah porta yang melebar,
3. Kelompok F2: jaringan fibrosa daerah porta dengan beberapa septum,
4. Kelompok F3: beberapa septum jaringan fibrosis melibatkan beberapa porta, kerusakan intralobular,

Kelompok F4 tidak digunakan karena tidak ada tikus yang mencapai tahap sirosis hati.

4.2 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilaksanakan selama 7 bulan yaitu sejak 9 Juli 2018 dan berakhir tanggal 6 Februari 2019. Perlakuan dan pemeliharaan tikus bertempat di

Laboratorium Farmakologi FKUB yaitu berupa induksi CCl₄ dan pemberian MO. Pengecatan HE jaringan hati dilakukan di Lab Patologi Anatomi .

4.3 Populasi dan Sampel

4.3.1 Sampel Penelitian

Sampel penelitian ini menggunakan tikus putih (*Rattus novergicus*) strain wistar. Adapun kriteria inklusi dan eksklusi yaitu:

Kriteria inklusi:

1. Tikus jantan
2. Umur \pm 3 bulan
3. Berat badan 160-260 gram
4. Belum pernah mengalami perlakuan apapun
5. Tikus sehat (gerak aktif dan bulu tidak rontok)

Kriteria eksklusi :

1. Tikus tidak mau makan selama penelitian
2. Tikus sakit atau mati selama perlakuan. (Domitrović, *et al.*, 2009)

4.3.2 Estimasi Jumlah Sampel

Jumlah sampel yang akan digunakan dalam eksperimen dengan metode *random* (acak), menggunakan $r(t-1)(r-1) \geq 15$, dimana:

t : banyaknya kelompok perlakuan

r : jumlah pengulangan (replikasi) yang dipakaisebagaijumlahsampel

Pada penelitian ini t=5, sehingga didapatkan pengulangan sebesar :

$$(5-1)(r-1) \geq 15$$

$$4(r-1) \geq 15$$

$$4r-4 \geq 15$$

$$4r \geq 15+4$$

$$r \geq 19/4$$

$$r \geq 4,75 \text{ (dibulatkan menjadi 5)}$$

Jadi, jumlah sampel untuk pengulangan yang diperlukan di setiap kelompok perlakuan minimal 5. Sehingga total semua tikus yaitu $5 \times 5 = 25$ tikus. Untuk mengantisipasi adanya kematian tikus selama penelitian, akan ditambahkan faktor koreksi sebesar 20% di setiap kelompok. Sehingga jumlah sampel setiap kelompok adalah $5 + (5 \times 20\%) = 5 + 1 = 6$. Jadi total $6 \times 5 = 30$ tikus.

4.4 Variabel Penelitian

4.4.1 Variabel bebas

Ekspresi Kolagen-1 Jaringan Hati

4.4.2 Variabel tergantung

Derajat Fibrosis Hati

4.5 Definisi Operasional

1. Hewan coba yang digunakan adalah tikus *Rattus norvegicus* strain wistar jantan yang diperoleh dari Laboratorium Farmakologi FKUB.
2. Diet normal berupa pakan BR1 dibanding tepung yaitu 3:1 dengan air secukupnya masing-masing tikus 40 gram pakan setiap hari.
3. Paparan CCl_4 adalah pemberian injeksi CCl_4 10% ($\text{CCl}_4 / \text{corn oil} = 1:9$ volume) intraperitoneal dengan dosis 1,0 ml/KgBB, 2 kali seminggu (Li, *et al.*, 2012) selama 60 hari.
4. Ekstrak MO dilarutkan dalam 80mL *distilled water*, sehingga dosis yang diberikan adalah sbb: 150 mg/kgBB/hari (ekstrak MO 2400 mg) setara dengan 5 cc/kgBB/hari, 300 mg/kgBB/hari (ekstrak MO 4800 mg) setara

dengan 7,5 cc/kgBB/hari, dan 600 mg/kgBB/hari (ekstrak MO 9600 mg) setara dengan 10 cc/kgBB/hari, diberikan sesuai waktu yang ditentukan.

5. Ekspresi kolagen-I jaringan hati diukur memakai metode imunohistokimia (IHK) menggunakan antibodi monoclonal anti-collagen types I (DAKO, Carpinteria, CA, USA) dengan pengecatan Masson's trichrome. Jumlah kolagen-I dihitung di 10 tempat secara acak (400x) pada tiap irisan hati tiap tikus. (Hamza, 2010)
6. Derajat fibrosis jaringan hati ditentukan menurut skor Metavir dengan intepetasi:
 - F0 tidak ada fibrosis
 - F1 ada fibrosis terbatas di area porta, perisinusiodal atau intralobular
 - F2 beberapa fibrosis perifer di area porta, terbentuk septum fibrosa
 - F3 terbentuk beberapa septum fibrosa disertai kerusakan struktur intralobular, belum terlihat
 - F4 sudah terjadi sirosis.

Preparat diamati di bawah mikroskop cahaya dengan perbesaran 400x dan pembacaan dilakukan oleh satu ahli patologi anatomi dan satu peneliti. (Goodman, 2007)

7. Luas Fibrosis diukur secara kuantitatif dengan menggunakan mikroskop dengan sistem analisis computer pada sampel biopsi hati setelah pengecatan. Selain *staging*, program peghitungan ini dibutuhkan untuk mengukur luas fibrosis secara keseluruhan. (Wang *et al.*, 2015)

4.6 Alat dan Bahan Penelitian

4.6.1 Alat

- Alat Pemeliharaan Tikus
Kandang dari kotak berukuran 45 cm x 35,5 cm, 14,5 cm dengan alas sekam yang bersih dan kering serta diganti dua kali dalam seminggu (Senin dan Kamis), tutup kandang dari anyaman kawat, botol air dan tempat pakan tikus. Penimbangan berat badan dengan menggunakan neraca digital.
- Alat Pembuatan Pakan Tikus
Baskom plastik, timbangan, handscoon, gelas ukur, pengaduk, penggilingan pakan, nampan.
- Alat pembuatan dan pemberian larutan CCl_4 : pipet, beaker glass, spatula, spuit
- Alat euthanasia: spuit injeksi, sterofoam, gunting jaringan
- Alat euthanasia: spuit injeksi, sterofoam, gunting jaringan
- Alat pembuatan preparat: objek glass, *Automatik Tissue Tex Prosesor*, microtome, oven, tabung kecil, tempat *slide*, pipet
- Alat pengecatan HE: pipet
- Alat pengecatan IHK: pipet

4.6.2 Bahan

- Bahan proses ekstraksi MO: serbuk daun MO dan pelarut
- Hewan coba : tikus *rattus norvegicus* strain wistar sesuai kriteria inklusi.
- Hewan perawatan tikus : air, sekam, pakan tikus.
- Bahan pembuatan pakan standar : pakan merk B1 banding tepung 3:1 dan air secukupnya dengan total pakan 40 gram tiap tikus

- Bahan pembuatan larutan CCl_4 10%: minyak jagung.
- Bahan pengecatan HE : Hematoksilin, Alkohol (70%, 80%, 95%, absolut), Eosin, alkohol asam 1%, amonia lithium karbonat
- Bahan reagensia IHK : PBS, *Super Block*, antibodi primer, UltraTek HRP *anti-polyvalent*, UltraTek HRP, air deionisasi atau suling, DAB Chromogen, Hematoxylin, Berikan *Bluing Reagent*
- Bahan bedah tikus : alkohol, kapas, ketamin cair.

4.7 Prosedur Penelitian dan Pengumpulan Data

4.7.1 Ekstraksi *Moringa oleifera*

1. Serbuk daun MO yang telah dihaluskan dengan blender ditimbang sebanyak 100 gram, direndam dengan pelarut 900mL (1L).
2. Ekstrak dikocok selama 30 menit dan direndam 1 malam sampai mengendap lalu diambil lapisan atas yang merupakan campuran pelarut dan zat aktif. Proses ini dilakukan sebanyak 3 kali.
3. Ekstrak dimasukkan ke labu evaporasi 1L dan dipasang pada evaporator.
4. Water bath diisi air sampai penuh, diatur sampai 90°C atau sesuai dengan titik didih pelarut
5. Semua rangkaian alat dipasang dan disambungkan dengan aliran listrik
6. Pelarut dibiarkan terpisah dengan zat aktif
7. Aliran pelarut dibiarkan sampai berhenti menetes pad labu penampung (\pm 1,5 – 2 jam) \pm 900 mL
8. Didapatkan hasil ekstraksi kira-kira 1/5 dari bahan alam kering
9. Ekstrak kasar pekat dimasukkan ke botol plastik atau kaca disimpan di kulkas pada suhu -4°C (atau freezer).

4.7.2 Pembuatan CCl₄

1. CCl₄ ini diambil dengan pipet sebanyak 5 mL
2. Di dalam beaker glass CCl₄ ini dilarutkan dengan minyak jagung dengan ratio perbandingan 1:9, dimana 1 mL CCl₄ dan 9 mL dengan konsentrasi 10%, lalu diaduk hingga rata.

4.7.3 Pemeliharaan dan Perlakuan pada Tikus

1. Persiapan sebelum pemeliharaan
 - Tikus *Rattus norvegicus* strain wistar didapatkan dari Laboratorium Farmakologi FKUB.
 - Tikus diacak dan ditimbang terlebih dulu kemudian dibagi secara rata persebaran tikus dengan memperhatikan berat badan pada masing-masing kelompok perlakuan.
 - Mempersiapkan kandang tikus sejumlah 8 pada masing-masing kelompok. Setiap kandang isi 1 ekor tikus dan kandang diberi label sesuai dengan perlakuan, yaitu label Knegatif, Kpositif, KP-1, KP-2, dan KP-3 beserta nomor tikus pada masing-masing kelompok kandang (contoh: KP-1 2, tikus nomor 2 dalam K Perlakuan 1).
 - Kandang ditutup dengan menggunakan anyaman kawat berongga sehingga tikus tetap bisa bernafas dengan ventilasi udara yang cukup.
 - Ruang untuk menempatkan kandang bersuhu 25-28°C dengan kelembapan udara 50-70%.
 - Alas kandang berupa sekam dengan ketebalan secukupnya dan melakukan pergantian sekam setiap 2 kali dalam seminggu.
2. Perlakuan tikus

- Sebelum diberi perlakuan, tikus diadaptasikan terlebih dahulu selama satu minggu terhadap kondisi laboratorium. Tikus diberikan diet normal. Tikus ditimbang saat awal adaptasi dan akhir adaptasi untuk bisa dipantau bahwa tikus tidak mengalami penurunan berat badan dan tetap dalam kondisi yang sehat.
- Minum yang diberikan setiap hari adalah aquades yang ditempatkan pada botol minum ukuran 100 mL dan ada pipa dengan bola katup tempat keluarnya air minum dan ini diletakkan di atas kawat penutup kandang.
- Memberikan pakan BR1 banding tepung yaitu 3:1 dengan air secukupnya masing-masing tikus 40 gram pakan setiap hari.
- Tikus dikeluarkan dari kandang untuk diberikan perlakuan seperti menimbang berat badan, induksi fibrosis hati dengan karbon tetraklorida (CCl_4) dan pemberian sonde. Sebelum memegang tikus, peneliti mendekatkan diri dengan tikus agar tikus mengetahui keberadaan orang disekitarnya dan menghindari gigitan tikus. Pengeluaran tikus dari kandang dengan memegang ekor yang dekat dengan badan, setelah itu tikus didekatkan ke bagian lengan tangan yang memegang ekor tikus. Sedangkan tangan satunya memegang tubuh bagian atas dengan posisi kaki depan tikus diantara jari telunjuk dan jari tengah peneliti. Saat memegang bagian tubuh yang atas jangan terlalu kencang agar tikus dapat bernafas. Lalu, tangan lain memegang tubuh bagian bawah kemudian tikus diposisikan secara vertikal.

- Untuk kelompok negatif diinjeksi NaCl 0.9% dengan dosis 1 ml/kgBB dengan frekuensi dua kali seminggu yang digunakan sebagai plasebo.
- Memberikan ekstrak MO personele dengan dosis masing-masing kelompok perlakuan yang sudah ditetapkan. Pemberian ini sesuai dengan kelompok yang dimulai pada hari pertama saat injeksi CCl₄, diberikan setelah injeksi CCl₄ pertama pada hari yang sama lalu dilanjutkan setiap hari.

3. Pemberian CCl₄

- Setelah adaptasi selama satu minggu, dilakukan injeksi CCl₄ secara intraperitoneal.
- Untuk setiap injeksi dosisnya yaitu 1cc/kgBB setiap 2 kali per minggu selama 13 minggu untuk kelompok perlakuan. Tikus ditimbang terlebih dahulu berat badannya untuk menentukan dosis karbon tetraklorida.
- Di bagian yang akan disuntik harus di bersihkan dulu dengan kapas yang diberi alkohol dengan arah sirkuler dari medial ke lateral.
- CCl₄ disuntikkan di bagian kuadran kanan bawah abdomen untuk menghindari tertusuknya organ-organ vital.

4. Pembedahan

Sebelum dilakukan pembedahan, tikus harus dieuthanasia terlebih dahulu. Euthanasia ini dilakukan dengan Ketamin injeksi intraperitoneal (IP) dengan dosis 0,5 mg/kgBB dengan range dosis 0,5 – 2,5 mg/kgBB untuk mendapatkan efek analgesia (Mohammad, 2012). Berikut adalah tahapan yang harus dilakukan saat pembedahan :

- Tikus dieuthanasia terlebih dahulu dengan ketamin secara IP
- Tikus ditempatkan di atas papan bedah yang diberi alas oleh steroform.
- Pastikan, tubuh, terutama tangan dan kaki tikus terfiksasi dengan baik agar mudah dalam melakukan pembedahan.
- Pembedahan dilakukan di bagian abdomen. Sebelum dibedah, bulu dibagian abdomen dapat dicukur terlebih dahulu kemudian dibersihkan.
- Pembedahan dapat dilakukan dengan menggunakan gunting bengkok.
- Mengambil organ yang akan diteliti (hati)
- Cuci organ dengan aquades berulang-ulang hingga bersih hingga tidak ada lemak-lemak yang menempel pada organ.
- Setelah cuci organ dengan NaCl 0,9%
- Tempatkan organ diatas kertas saring
- Lalu organ dipindah ke cawan petri untuk ditimbang jika air sudah berkurang. Catat hasil timbangan.
- Organ yang sudah di timbang di masukkan ke dalam pot berisi formalin 4% dan buffer formalin.
- Pembedahan dilakukan sesuai dengan waktu yang sudah ditentukan untuk munculnya fibrosis dan sirosis hati.
- Setelah dilakukan pembedahan maka tubuh tikus dikuburkan dan area pembedahan dibersihkan.

5. Tindakan euthanasia

Proses euthanasia di penelitian ini menggunakan ketamin secara IP. Metode ini dilakukan dengan cara menyuntikkan ketamin pada tikus secara intraperitoneal. Ketamin merupakan anestesi disosiatif dengan organ target otak pada bagian ganglia basalis, thalamus, batang otak dan beberapa sel neuron yang berhubungan dengan korteks otak. Kerja dari ketamin yaitu sebagai antagonis *N-methyl-D-aspartat* reseptor agar terjadi efek analgesi dan anestesi pada manusia dan tikus. (Mohammad *et al.*, 2012)

6. Yang perlu di perhatikan selama pemeliharaan :

- Injeksi CCl₄ dapat menimbulkan kondisi stres pada tikus, untuk itu lakukan dengan teknik yang tepat, tenang, dan hati-hati.
- Untuk mencegah timbulnya infeksi akibat penyuntikan CCl₄

4.7.4 Pembedahan dan Pengambilan Organ

Pembedahan ini dilakukan setelah dilakukan euthanasia pada hewan coba dengan menggunakan gas eter secara inhalasi. Berikut langkah/tahapan-tahapan yang dilakukan pada pembedahan hewan coba:

- Pembedahan sesuai dengan waktu yang sudah ditentukan untuk mendapat semua derajat fibrosis hati.
- Tikus di euthanasia dengan injeksi IP ketamin, setelah itu baru dilakukan pembedahan.
- Tikus ditempatkan di papan bedah yang keras dan dialasi dengan streofoam. Kaki dan tangan tikus difiksasi dengan jarum pentul pada atas streofoam.

- Torak dan abdomen tikus dibuka dengan memotong dinding abdomen (kulit dan peritoneum) pada aksis median. Pembedahan ini diperluas sampai ke lateral agar organ bagian dalam rongga abdomen terlihat.
- Selanjutnya yaitu pengambilan organ hati untuk diperiksa derajat fibrosis hati dengan histopatologi jaringan hati.

4.7.5 Pembuatan Preparat Histologi Jaringan Hati

Pembuatan *slide* jaringan hati dilakukan sebagai langkah awal dalam pengukuran derajat fibrosis dan ekspresi Kolagen-1 jaringan hati. Proses pembuatan dilakukan di Lab Patologi Anatomi (PA) FKUB dengan cara sebagai berikut:

1. Jaringan atau spesimen penelitian harus sudah terfiksasi dengan formalin atau dengan bafer formalin 10% minimal selama 7 jam sebelum dilakukan proses pengerjaan berikutnya
2. Jaringan dipilih yang terbaik sesuai dengan lokasi yang diteliti (lobus medial hati tikus)
3. Jaringan dipotong kurang lebih ketebalan 2-3 milimeter
4. Dimasukkan ke kaset dan diberi kode sesuai dengan kode gross peneliti
5. Jaringan kemudian diproses dengan alat *Automatik Tissue Tex Prosesor* atau dengan cara manual
6. Standar di Lab PA FKUB menggunakan *Tissue Tex Prosesor* selama 90 menit. Jika alarm menyala tandanya proses selesai.
7. Jaringan diangkat dari mesin *Tissue Tex Prosesor* kemudian diblok dengan paraffin sesuai kode jaringan
8. Jaringan dipotong dengan alat *microtome* ketebalan 3-5 mikron

9. Jaringan yang akan dilakukan pewarnaan dideparafinisasi terlebih dulu
10. Jaringan dideparafinisasi yaitu dengan menaruh dalam oven selama 30 menit dengan suhu panas 70-80°C
11. Masukkan jaringan ke dalam 2 tabung larutan xylol masing-masing 20 menit
12. Masukkan jaringan ke 4 tabung alkohol masing-masing tempat 3 menit (hidrasi)
13. Masukkan jaringan ke air mengalir selama 15 menit

4.7.6 Pemeriksaan Patologi Anatomi Jaringan Hati Tikus Model Fibrosis

Pengukuran derajat fibrosis di jaringan hati tikus model fibrosis hati dilakukan menggunakan metode histopatologi yang ditentukan dengan skor Metavir. Metode histopatologi dilakukan sesuai dengan petunjuk yang diterapkan pada lab Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Jenis pengecatan histopatologi yaitu dengan menggunakan *Masson's Trichrome* (MT) dengan prosedur sebagai berikut:

1. Preparat yang sudah dideparafinisasi kemudian panaskan larutan Bouin's (untuk membuka epitope jaringan) di waterbath 56-64 °C di lemari asam/ area yang berventilasi bagus
2. Kemudian teteskan 5-10 tetes larutan tersebut ke jaringan selama 6 menit. Lalu tempatkan slide di chamber, kemudian chamber dimasukkan ke waterbath atau cuci 1x tap water selama 3-5 menit
3. Kemudian cuci lagi dengan aquades 1x
4. Lalu campur Weigert A dan Weigert B 1:1, setelah dicampur lalu teteskan ke jaringan selama 5-10 menit, jangan sampai kering

5. Keringkan dengan tissue, bagian jaringan tidak boleh dibersihkan
6. Cuci slide dengan air mengalir selama 2 menit
7. Cuci slide dengan aquades
8. Teteskan 5-10 tetes larutan Acid Fuchsin ke jaringan selama 5-15 menit. Lalu cuci kembali dengan aquades
9. Bedakan bagian jaringan yang diwarnai dengan 5-10 tetes larutan Phosphomolybdic selama 10-15 menit atau setelah kolagen tidak berwarna merah
10. Tanpa dicuci, teteskan 5-10 larutan Anilin Blue ke jaringan selama 5-10 menit. Cuci lagi slide dengan Aquades
11. Teteskan 5-10 larutan acid 1% ke jaringan selama 3-5 menit (untuk mempertajam warna)
12. Dehidrasi dengan cepat di 2 perubahan alcohol absolut selama 3-5 menit
13. Lalu lakukan cleaning xylol selama 3-5 menit
14. Dapat dilakukan pengamatan di bawah mikroskop.

4.7.7 Penghitungan Ekspresi Kolagen-1 Jaringan Hati Tikus Model Fibrosis Hati

Ekspresi Kolagen-1 di jaringan hati tikus model fibrosis hati dilakukan menggunakan kit *Scytek* dengan metode imunohistokimia. Metode imunohistokimia dilakukan sesuai dengan petunjuk yang tertera pada kit. Antibodi dan jenis pengecatan yang digunakan adalah antibodi *COL1A1 goat pyclonal* dari *Santa Cruz* dengan prosedur sebagai berikut:

1. Setelah dilakukan deparafinsasi, keringkan jaringan hati

2. Inkubasi preparat dengan *Peroxide Block* selama 10 menit untuk mengurangi pewarnaan background yang tidak diinginkan akibat peroksidase endogen
3. Cuci 2 kali dengan buffer (PBS masing-masing 3 menit)
4. Jika dibutuhkan, inkubasi jaringan dengan enzim *digestive*
5. Cuci 4 kali dengan buffer
6. Berikan *Super Block* dan inkubasi selama 5 menit pada suhu ruangan untuk *block* pewarnaan *background* nonspesifik
7. Cuci 1 kali dengan buffer
8. Berikan antibodi primer dan inkubasi semalaman di dalam kulkas 5°C
9. Cuci 4 kali dengan buffer
10. Berikan UltraTek HRP *anti-polyvalent* dan inkubasi selama 10 menit pada suhu ruangan
11. Cuci 4 kali dengan buffer
12. Berikan UltraTek HRP dan inkubasi selama 10 menit pada suhu ruangan
13. Rendam 3 kali dengan buffer
14. Rendam 1 kali dengan air deionisasi atau suling
15. Tambah 1 tetes (40-50µL) DAB Chromogen pada masing-masing 1 mL *DAB Substrate High Contrast* campur dengan cara diputar-putar dan dibiarkan selama 5 menit
16. Rendam 1 kali dengan air deionisasi atau suling
17. Berikan campuran *DAB Chromogen/Substrate* dan inkubasi selama 5 detik

18. Rendam 3 kali dengan air deionisasi atau suling
19. Berikan Hematoxylin, *Mayer's (Lillie's Modification)* dan inkubasi selama 1-2 menit
20. Rendam 3 kali dengan air deionisasi atau suling
21. Berikan *Bluing Reagent* selama 5-10 detik
22. Rendam segera dengan air deionisasi atau suling
23. Keringkan preparat dan bersihkan dengan xylene atau *xylene substitute*
24. Tutup preparat dengan media yang permanen.

Slide yang telah discan kemudian dihitung ekspresi kolagen-1 pada perbesaran 400x di 10 lapang pandang.

4.8 Pengolahan Data

4.8.1 Uji Analisis

Proses pengolahan data hasil penelitian dianalisis secara komputerisasi dengan menggunakan software *Statistical Product and Service Solution*, IBM SPSS Statistics 20 dengan tingkat signifikansi atau nilai probabilitas 0,05 ($p=0,05$) dan taraf kepercayaan 95% ($\alpha=0,05$). Data ekspresi Kolagen-1 jaringan (Kelompok F0, F1, F2,) selanjutnya diolah sebagai berikut:

1. Uji Normalitas

Sebelum dilakukan uji statistik, sebaran data ekspresi Kolagen-1 yang diperoleh harus normal. Oleh karena itu dilakukan uji normalitas data dengan metode Shapiro-Wilk dengan $p>0.05$

2. Uji Homogenitas

Selain dengan uji normalitas, sebaran data harus homogen dengan uji homogenitas menggunakan uji Levine dengan $p > 0.05$

3. Uji Analisis Statistik

Jika uji asumsi data terpenuhi yaitu sebaran data normal dan varian data homogen ($p < 0.05$), maka digunakan uji analisis statistika parametrik yaitu dengan uji *One Way ANOVA*. Untuk membandingkan ekspresi kolagen-1 kelompok tikus model fibrosis hati dengan perlakuan CCl_4 dengan kelompok tikus dengan placebo NaCl dilakukan uji beda *independent T-test*.

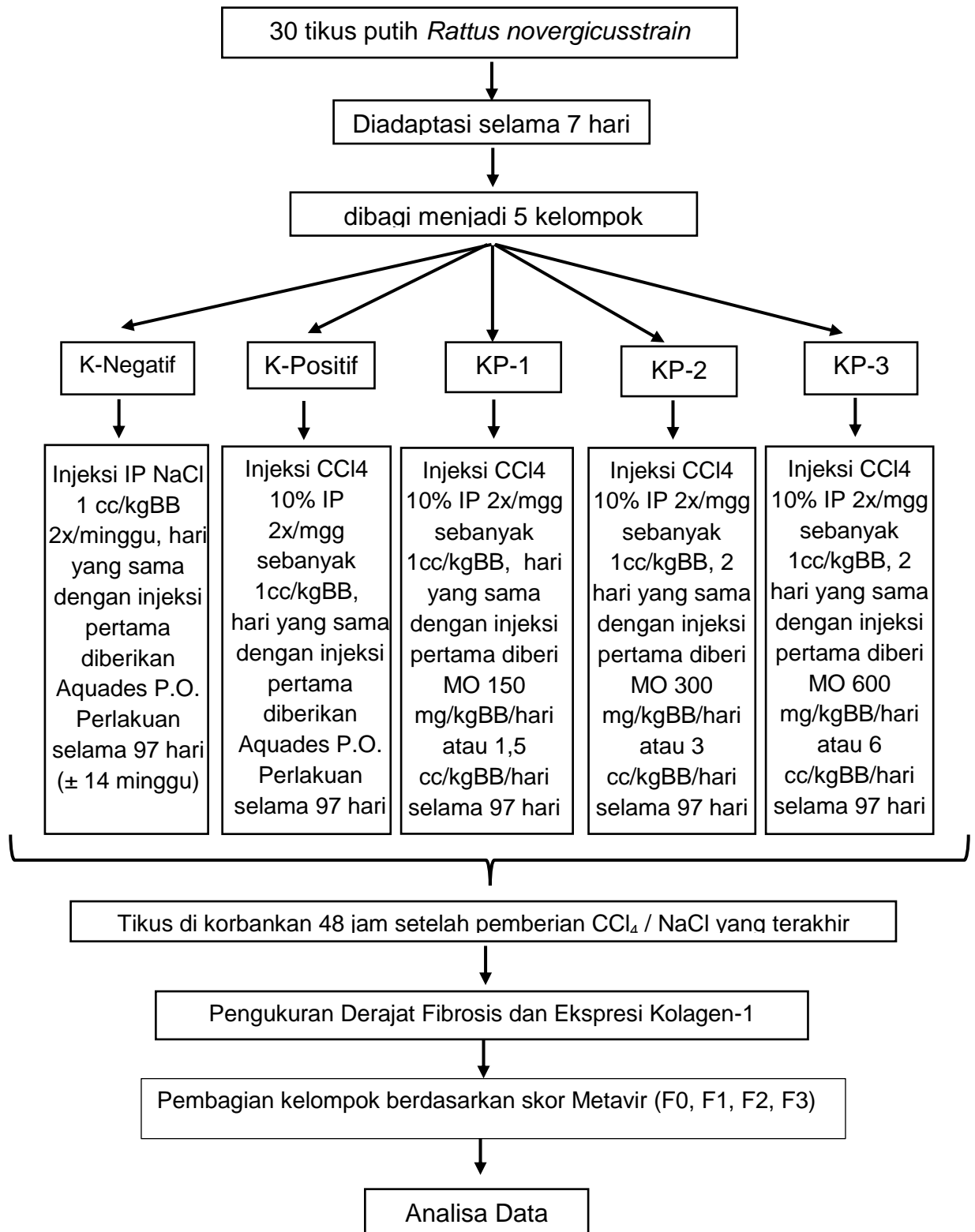
4. Uji Beda *Post Hoc*

Uji beda dilakukan untuk mengetahui adanya perbedaan yang signifikan ekspresi Kolagen-1 pada masing-masing kelompok. Didapatkan perbedaan yang signifikan apabila nilai signifikansi sebesar $p < 0.05$

5. Uji Korelasi *Spearman*

Untuk mengetahui apakah ada hubungan antara ekspresi Kolagen-1 jaringan hati dengan derajat fibrosis hati pada tikus model fibrosis hati maka dilakukan uji korelasi *Spearman* yang ditujukan untuk mengetahui hubungan 2 variabel numerik (ekpresi Kolagen-1 dan luas fibrosis). Dari hasil uji korelasi ini, hasil menunjukkan ada korelasi apabila $p < 0.05$ dan dilihat koefisien korelasi.

4.9 Alur Penelitian



BAB 5

HASIL DAN ANALISIS PENELITIAN

5.1 Hasil Penelitian

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui hubungan ekspresi Kolagen-1 dengan derajat fibrosis hati pada tikus model fibrosis hati. Pada penelitian ini, hewan coba menggunakan 30 tikus putih *Wistar* yang dibagi menjadi 5 kelompok perlakuan yaitu Kelompok Negatif, Kelompok Positif, Kelompok Perlakuan 1, Kelompok perlakuan 2, Kelompok Perlakuan 3. Pembagian kelompok ini sesuai dengan penelitian payung untuk mengetahui efek daun *Moringa oleifera* (MO) pada dosis yang berbeda. Perlakuan pada tikus berlangsung selama ± 13 minggu dari pemberian MO dan CCl₄ hingga pembedahan tikus dilakukan. Setelah dilakukan pembedahan, organ hati kemudian diambil dan dibuatkan sampel biopsi hati untuk mengetahui derajat dan luas fibrosis hati serta menghitung ekspresi kolagen jaringan hati. Identifikasi derajat dan luas fibrosis menggunakan pengecatan histopatologi dengan *Masson's trichrome* (MT) yang kemudian diukur luasnya dengan mikroskop *dotslide* dan dinilai derajat fibrosisnya dengan skor Metavir. Sementara untuk melihat ekspresi Kolagen menggunakan metode immuno histokimia (IHK) dan penghitungannya dilakukan secara manual dengan aplikasi *Image Rester* 3.0 pada komputer. Hasil yang didapatkan dari penelitian ini terlampir pada lampiran 1.

Untuk mengetahui hubungan ekspresi Kolagen-1 dengan derajat fibrosis maka penulis menglompokkan tikus berdasarkan skor Metavir sebagai berikut:

Tabel 5.1 Kelompok Tikus Berdasarkan Derajat Fibrosis

Derajat Fibrosis	Nama Tikus	Kolagen (%)	Luas Fibrosis (μm^2)
F0	KNEG 1	9.02	981.37
	KNEG 2	12.48	978.96
	KNEG 3	8.60	944.05
	KNEG 4	7.92	949.79
	KNEG 5	9.99	927.94
	KNEG 6	12.12	969.59
F1	KP3-1	9.50	8065.91
	KP3-2	8.56	8195.25
F2	KP2-3	14.78	23228.01
	KP3-3	10.60	21614.48
	KP3-4	7.94	21119.19
	KP3-5	7.38	21435.06
	KP3-6	11.65	22681.43
F3	KPOS 1	19.35	60928.99
	KPOS 2	16.39	62812.01
	KPOS 3	16.84	57220.38
	KPOS 4	26.36	51457.5
	KPOS 5	26.41	62532.61
	KPOS 6	18.89	53568.14
	KP1-1	12.78	57234.81
	KP1-2	21.48	53114.71
	KP1-3	19.59	50344.35
	KP1-4	31.21	56434.59
	KP1-5	20.65	49153.57
	KP1-6	12.15	50687.54
	KP2-1	23.13	44085.85
	KP2-2	13.89	51996
	KP2-4	15.61	49840.02
	KP2-5	11.62	45808.36
	KP2-6	11.67	38613.09

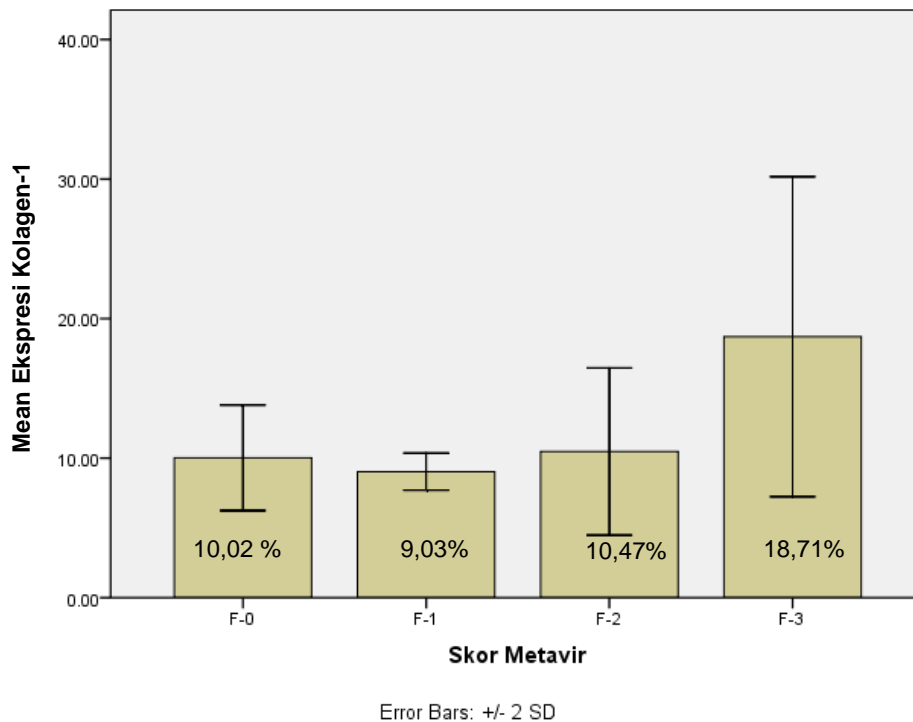
Berdasarkan table di atas, terdapat 4 kelompok tikus berdasarkan derajat fibrosisnya dan persebaran jumlah tikus tidak merata. Pada kelompok F0 terdapat 6 kelompok yang semuanya berasal dari Kelompok Negatif. Kelompok F1 memiliki paling jumlah tikus paling sedikit yaitu 2 tikus yang berasal dari Kelompok Perlakuan 3. Jumlah tikus pada Kelompok F2 yaitu 6

tikus, 1 tikus berasal dari Kelompok Perlakuan 2 dan 5 dari Kelompok Perlakuan 3. Sementara itu, kelompok F3 mempunyai jumlah tikus terbanyak dari seluruh kelompok yaitu berjumlah 17 tikus yang berasal dari seluruh Kelompok Positif, seluruh Kelompok Perlakuan 1, dan sebagian Kelompok Perlakuan 2.

Tabel 5.2 Kelompok Tikus Model Fibrosis K-Positif dan K-Negatif

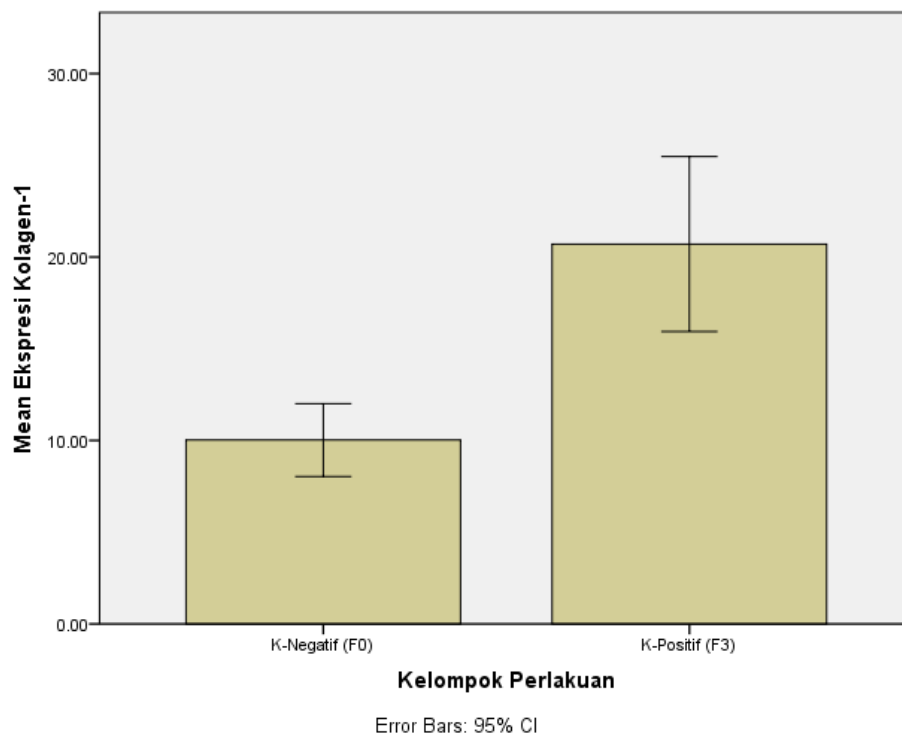
PERLAKUAN	TIKUS	EKSPRESI KOLAGEN-1 (%)	MEAN EKSPRESI KOLAGEN-1 (%)	DERAJAT FIBROSIS
K- NEGATIF	1 (KNEG 1)	9.02	9.99	F0
	2 (KNEG 2)	12.48		F0
	3 (KNEG 3)	8.60		F0
	4 (KNEG 4)	7.92		F0
	5 (KNEG 5)	9.99		F0
	6 (KNEG 6)	12.12		F0
K-POSITIF	1 (KPOS 1)	19.35	20.71	F3
	2 (KPOS 2)	16.39		F3
	3 (KPOS3)	16.84		F3
	4 (KPOS 4)	26.36		F3
	5 (KPOS 5)	26.41		F3
	6 (KPOS 6)	18.89		F3

Berdasarkan tabel 5.2 didapatkan hasil derajat fibrosis dan rerata ekspresi kolagen-1 pada K-Negatif dan K-Positif. Pada K-Neg semua tikus memiliki skor Metavir F0 serta semua tikus K-Pos memiliki skor Metavir F3.



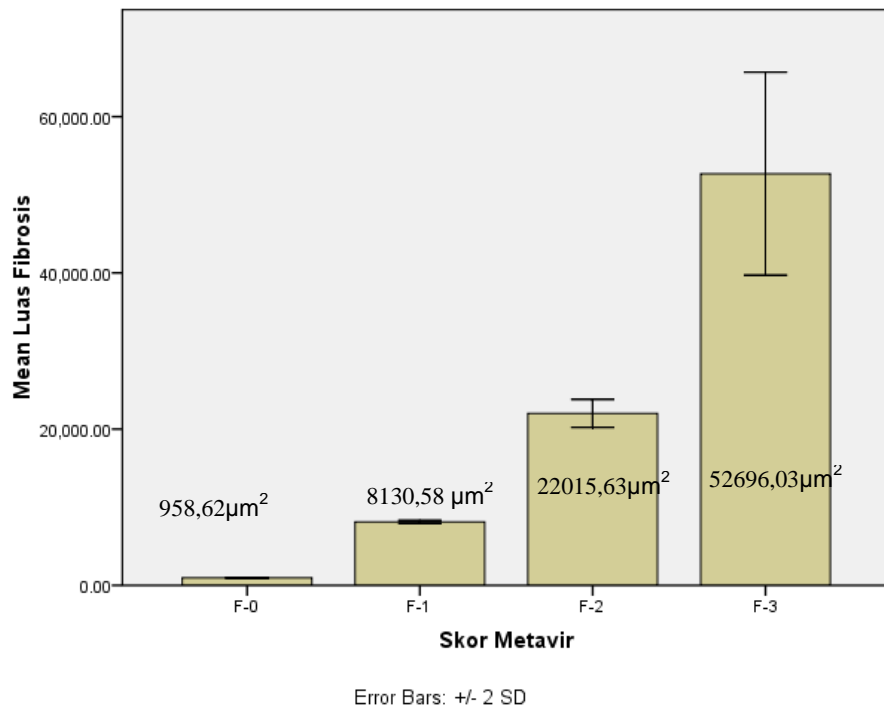
Gambar 5.1 Grafik rerata ekspresi Kolagen-1 masing-masing kelompok berdasarkan skor Metavir

Berdasarkan Gambar 5.1, Kelompok F0 memiliki rerata ekspresi Kolagen-1 10,02% lalu sedikit menurun pada kelompok F1 dengan ekspresi Kolagen-1 9,03%. Kemudian mengalami kenaikan sedikit pada kelompok F2 (10,47%) dan F3 memiliki ekspresi Kolagen-1 tertinggi yaitu 18,71%. Perbandingan rerata Kolagen-1 F0 dan F1 memiliki nilai signifikansi ($p= 0,689$) sementara perbandingan F1 dan F2 memiliki nilai signifikansi ($p=0,617$). Sehingga penurunan ekspresi Kolagen dari F0 ke F1 dan kenaikan ekspresi kolagen dari F1 ke F2 secara statistik tidak signifikan. Namun, kenaikan ekspresi Kolagen-1 dari F2 ke F3 saat dibandingkan memiliki nilai signifikansi ($p=0,00$), begitu pula dengan kelompok F0 dan F1. Maka dapat disimpulkan bahwa kenaikan ekspresi Kolagen-1 paling signifikan pada F3.



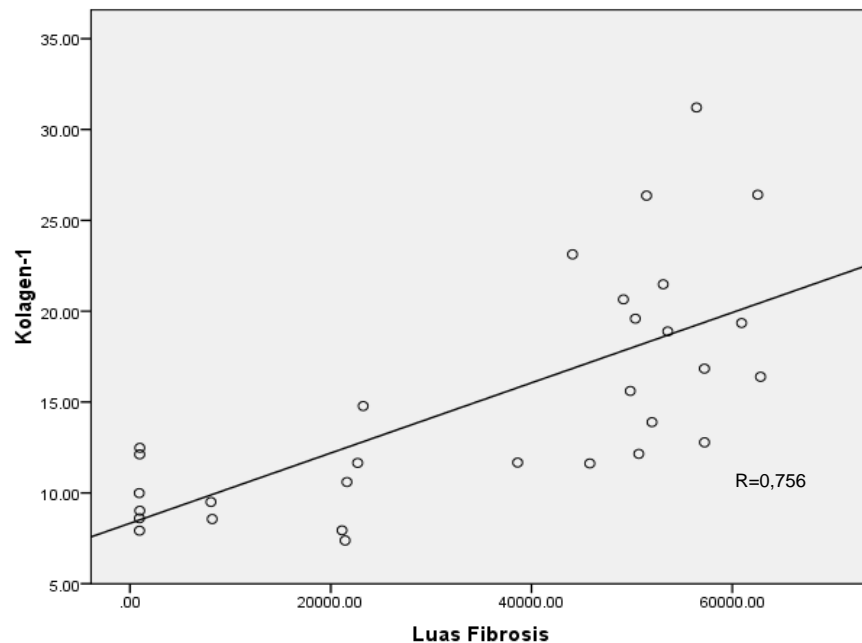
Gambar 5.3 Grafik Rerata Ekspresi Kolagen-1 pada K-Positif dan K-Negatif

Gambar di atas menunjukkan perbandingan rerata ekspresi kolagen-1 pada kelompok model fibrosis (diberi CCl_4) dan yang bukan model fibrosis (diberi NaCl). Rerata ekspresi kolagen-1 dari K-Neg sejumlah 9,99% sedangkan pada K-Pos mencapai 20,71%.



Gambar 5.3 Grafik Rerata Luas Fibrosis masing-masing kelompok berdasarkan skor Metavir

Berdasarkan gambar 5.3, data diketahui bahwa rerata luas fibrosis hati kelompok F0 sebesar $958,62\mu\text{m}^2$, kelompok F1 sebesar $8130,58\mu\text{m}^2$, dan terus meningkat pada kelompok F2 sebesar $22015,63\mu\text{m}^2$ serta pada kelompok F3 sebesar $52696,03\mu\text{m}^2$ peningkatan luas yang ada, memiliki nilai signifikansi ($p=0,000$) pada perbandingan F0 dengan F3 serta F2 dengan F3. Selain itu, pada perbandingan F1 dengan F2 memiliki nilai ($p=0,004$) dan perbandingan F0 dengan F2 memiliki nilai ($p=0,012$). Hal ini membuktikan bahwa peningkatan luas secara statistik signifikan pada dari kelompok F1 menuju F2, F2 menuju F3, dan terjadi perbedaan yang sangat signifikan pada F0 dengan F3.



Gambar 5.4 Grafik scatter plot Luas Fibrosis dengan ekspresi Kolagen-1

Pada gambar 5.4, ditunjukkan persebaran ekspresi kolagen pada tiap luas fibrosis. Menurut grafik didapatkan suatu korelasi (+) dengan koefisien $r=0,756$.

5.2 Analisis Data

Hasil penelitian ini dianalisis secara statisti menggunakan software SPSS versi 16. Hasil analisis yang didapatkan berupa output program tersebut. Adapun penjelasan output sebagai berikut.

5.2.1 Uji Normalitas

Dari hasil pengamatan sampel penelitian, dilakukan uji normalitas data untuk mengetahui distribusi/sebaran data. Hasil analisis lengkapnya terdapat di Lampiran 2. Berdasarkan pengujian normalitas data menunjukkan bahwa data hasil ekspresi Kolagen-1 memiliki nilai signifikansi ($p=0,382$) lebih besar dari α (0.05) setelah ditransformasi, sehingga dapat disimpulkan bahwa data tersebut menyebar mengikuti sebaran normal. Dengan demikian dapat dilakukan

pengujian dengan *one-way* ANOVA, karena asumsi kenormalan distribusi data telah terpenuhi. Sementara uji normalitas data pada Luas Fibrosis memiliki nilai signifikansi ($p=0,000$) setelah ditransformasi, sehingga dapat disimpulkan data Luas Fibrosis tidak terdistribusi normal. Oleh karena itu, penggunaan uji *Kruskal-Wallis* digunakan untuk menggantikan uji *one-way* ANOVA karena tidak memenuhi syarat.

5.2.2 Uji Homogenitas

Dari hasil pengamatan sampel penelitian, dilakukan uji homogenitas data untuk mengetahui bahwa sekumpulan data memiliki kesamaan ragam antar kelompok. Pada penelitian ini dilakukan uji Levene (*Levene Test Homogeneity*). Hasil analisis lengkapnya terdapat di Lampiran 2. Berdasarkan hasil uji Levene untuk ekspresi Kolagen-1 memiliki nilai signifikansi 0,196 yang lebih besar dari nilai α 0.05 ($p>0.05$), sehingga dapat disimpulkan bahwa data ekspresi Kolagen-1 tersebut relatif homogen. Dengan demikian dapat dilakukan pengujian *one-way Anova*, karena asumsi homogenitas ragam data telah terpenuhi.

5.2.3 Uji Perbedaan Ekspresi Kolagen-1 menggunakan *One Way Anova*

Berdasarkan uji *one-way Anova* nilai signifikansi sebesar 0,000 lebih kecil dari α (0.05), sehingga dapat disimpulkan bahwa terdapat perbedaan rata-rata ekspresi Kolagen-1 pada masing-masing kelompok. Maka dapat disimpulkan bahwa terdapat perbedaan signifikan dengan empat kelompok berdasarkan derajat fibrosis. Untuk melihat letak perbedaannya, dilakukan uji lanjut dengan uji LSD. Hasil analisis lengkapnya dapat dilihat di Lampiran 2.

Tabel 5.3 Resume Output *Post Hoc*

KELOMPOK METAVIR	F0	F1	F2	F3
F0		0.689	0.878	0.000*
F1	0.689		0.617	0.003*
F2	0.878	0.617		0.000*
F3	0.000*	0.003*	0.000*	

Keterangan:

Tanda(*): nilai $p < 0,05$; terdapat perbedaan signifikan diantara dua kelompok.

Berdasarkan hasil yang tercantum diperoleh bahwa kelompok F0, F1 dan F2 memiliki perbedaan yang signifikan dengan F3. Namun untuk perbandingan F0 dengan F1, F0 dengan F2, serta F1 dengan F2 memberikan perbedaan yang tidak signifikan. Sehingga dari hal ini dapat diketahui bahwa kenaikan ekspresi Kolagen-1 sangat signifikan terjadi pada derajat fibrosis F3.

5.2.4 Uji Perbedaan Luas Fibrosis menggunakan *Kruskal-Wallis*

Untuk mengetahui perbedaan luas fibrosis pada masing-masing kelompok derajat fibrosis maka dilakukan *Kruskal-Wallis*. Berdasarkan uji yang dilakukan nilai nilai signifikansi sebesar 0,000 lebih kecil dari α (0.05), sehingga dapat disimpulkan bahwa terdapat perbedaan rata-rata luas fibrosis pada masing-masing kelompok. Maka dapat disimpulkan bahwa terdapat perbedaan signifikan dengan empat kelompok berdasarkan derajat fibrosis. Untuk melihat letak perbedaannya, dilakukan uji lanjut dengan uji *Mann-Whitney*. Hasil analisis lengkapnya dapat dilihat di Lampiran 2

Tabel 5.4 Resume *Output Mann-Whitney*

KELOMPOK METAVIR	F0	F1	F2	F3
F0		0.071	0.004*	.000*
F1	0.071		0.095	0.012*
F2	0.004*	0.095		.000*
F3	0.000*	0.012*	.000*	

Keterangan:

Tanda(*): nilai $p < 0,05$; terdapat perbedaan signifikan diantara dua kelompok.

Berdasarkan table diatas, diperoleh bahwa kelompok F0, F1 dan F2 memiliki perbedaan yang signifikan dengan F3. Begitu pula dengan perbedaan F0 dengan F2. Namun untuk perbandingan F0 dengan F1, serta F1 dengan F2 memberikan perbedaan yang tidak signifikan. Sehingga dari hal ini dapat diketahui bahwa kenaikan ekspresi Kolagen-1 sangat signifikan terjadi pada derajat fibrosis F3 serta pada F2 terhadap F0.

5.2.5 Uji *independent T-test* K-Negatif dan K-Positif

Uji T-test dilakukan untuk membandingkan ekspresi kolagen-1 pada kelompok perlakuan positif (F3) dan kelompok perlakuan negatif (F0). Hasil yang diperoleh memiliki nilai Sig. (2-tailed) sebesar 0,000 ($< 0,05$). Sehingga dapat dinyatakan bahwa kedua kelompok memiliki perbedaan ekspresi kolagen-1 yang signifikan. Hasil dapat dilihat pada lampiran 2.

5.2.6 Uji Korelasi *Spearman*

Uji korelasi dilakukan untuk mengetahui hubungan antara ekspresi Kolagen-1 dengan derajat fibrosis hati. Setelah dilakukan penghitungan rerata dan uji perbandingan statistik, penggunaan luas fibrosis hati pada masing-

masing tikus tidak berjauhan berbeda dengan kolagen-1 pada perbandingan tiap kelompok fibrosis. Oleh karena itu, uji *Spearman* dilakukan untuk mengetahui hubungan ekspresi kolagen-1 dengan luas fibrosis masing-masing tikus sendiri. Penggunaan uji ini dikarenakan persebaran data luas fibrosis tidak tersebar secara normal. Hasil uji korelasi yang dilakukan diketahui bahwa hubungan ekspresi kolagen-1 jaringan hati dengan luas fibrosis hati didapatkan nilai signifikansi 0,000, lebih kecil dari α (0.05) yang berarti terdapat hubungan yang signifikan antara kadar ekspresi kolagen-1 dengan luas fibrosis hati masing-masing tikus. Hubungan yang sangat kuat dan searah antara ekspresi kolagen-1 dengan luas fibrosis hati tiap tikus pada taraf nyata 5% ditunjukkan dengan nilai korelasi yang positif sebesar 0,756. Dengan hal tersebut dapat disimpulkan bahwa semakin besar ekspresi kolagen-1 jaringan hati maka luas fibrosis hati juga ikut bertambah atau sebaliknya, semakin kecil ekspresi kolagen-1 jaringan hati maka makin sedikit luas fibrosis hati yang terjadi. Hasil analisis lengkap uji korelasi antara ekspresi kolagen-1 dengan luas fibrosis hati dapat dilihat pada Lampiran 2.

BAB 6

PEMBAHASAN

6.1 Pembahasan Hasil Penelitian

Fibrosis hati merupakan respon penyembuhan luka yang *reversible* dari perlukaan hati dengan adanya penumpukan ECM (Hernandez-Gea, 2017). Penumpukan ECM yang tidak terkontrol dikarenakan adanya injuri atau perlukaan menetap yang mengakibatkan ketidakseimbangan produksi ECM (Arriazu, *et al.*, 2013). Maka dalam penelitian payung yang diikuti penulis, tikus mendapatkan injeksi CCl₄ secara kronik (13 minggu) untuk mendapatkan efek fibrosis hati. Kemudian pemberian MO juga menghasilkan berbagai efek fibrosis hati yang berbeda-beda pada masing-masing tikus karena diharapkan terjadi proses *healing* atau penyembuhan. Menurut Birukawa *et al.* (2014), jika keadaan penyakit atau jejas kronik dihilangkan atau dihentikan, a-HSC akan memulai apoptosisnya dengan deaktivasi secara parsial dan kemudian terjadi resolusi secara spontan.

Berdasarkan Gambar 5.1, diketahui bahwa rerata ekspresi kolagen-1 F0 lebih besar daripada F1. Secara normal, hati memproduksi ECM secara seimbang dengan degradasinya (Arriazu *et al.* 2013). Hal ini membuktikan bahwa dalam kondisi normal, kolagen-1 juga diproduksi oleh hati tetapi juga dalam keseimbangan atau homeostasis. Selain itu, hal ini juga dapat terjadi karena pengambilan daerah lapang pandang yang subjektif dari peneliti sehingga penghitungan kolagen-1 pada kelompok F0 terlihat lebih banyak daripada kelompok F1. Penurunan kolagen-1 terjadi tetapi jika dibandingkan pada luas fibrosis mengalami peningkatan. Fibrosis juga terjadi akibat penumpukan ECM

yang berlebih. Penyusun ECM tidak hanya kolagen-1 saja, juga ada beberapa jaringan ikat lain, kolagen-3, kolagen-4 dan fibronectin lain (Karsdal, 2013). Pada kondisi jejas atau perlukaan akut masih ada sel-sel pro inflamasi yang terlibat, salah satunya sel Kupffer. Sel Kupffer yang teraktifasi juga mengekspresikan kolagen lain yaitu kolagen-4 sebagai penyusun jaringan ikat fibrous nantinya (Duarte, *et al.*, 2015). Kolagen lain tidak diamati dalam penelitian ini sehingga seolah-olah kolagen-1 tampak lebih rendah pada F1 dibanding F0.

Perbandingan pada kelompok F1 dengan F2 serta kelompok F2 dengan kelompok F3, rerata kolagen-1 terus meningkat. Hal ini didukung karena keseimbangan ECM sangat terganggu pada fibrosis hati yang sudah lanjut. Sehingga, produksi kolagen-1 akan terus meningkat tanpa keseimbangan dari degradasi oleh MMP. Terlebih jika terjadi keadaan CLD (*chronic liver disease*) yang terlalu lama, apoptosis HSC mengalami apoptosis yang resisten (Pinzani, 2015). Kondisi tersebut menyebabkan produksi kolagen-1 akan berlanjut hingga ke tahap akhir dari CLD yaitu sirosis hati.

Perbandingan ekspresi kolagen-1 juga dilakukan pada tikus perlakuan K-Positif dengan K-Negatif. Kelompok positif dibuat model fibrosis dengan pemberian CCl₄ menunjukkan derajat fibrosis F3 pada semua tikusnya. Sedangkan semua tikus kelompok negatif diberikan placebo dengan injeksi NaCl menunjukkan F0. Perbandingan kedua kelompok ini memiliki perbedaan yang signifikan, dengan rerata ekspresi kolagen-1 K-Positif dengan derajat fibrosis F3 lebih banyak dari K-Negatif dengan derajat fibrosis F0. Pada pengukuran skor Metavir, semakin tinggi skor semakin luas dan banyak penumpukan ECM yang terjadi (Goodman, 2007). Peningkatan ECM yang ada menandakan bahwa

komposisi jaringan fibros meningkat, salah satunya Kolagen-1 (Arriazu *et al.* 2013).

Derajat keparahan yang dapat ditentukan salah satunya derajat fibrosis dalam perjalanannya menjadi sirosis. Pembacaan derajat fibrosis merupakan bentuk *semiquantitative* untuk menentukan perjalanan penyakit (Pinzani, 2015). Hal ini dibuktikan pada hasil perbandingan rerata luas fibrosis hati pada masing-masing kelompok fibrosis meningkat secara bertahap sesuai derajatnya. Pada kelompok F1 memiliki perbedaan rerata luas sebesar $7171,96\mu^2$ atau delapan kali lebih luas dibanding kelompok F0. Kelompok F2 memiliki perbedaan rerata luas sebesar $13885,05\mu^2$ atau hampir tiga kali lebih luas dibanding kelompok F1. Sementara F3 memiliki luas fibrosis hati terluas dibanding dengan ketiga kelompok lain dengan selisih sebanyak $30680,4\mu^2$ atau dua kali lebih luas dari kelompok F2. Maka, tujuan untuk mengukur keparahan dan/atau progresifitas penyakit hati dengan menentukan derajat keparahannya dapat terbukti (Goodman, 2007). Namun, uji perbedaan statistik menunjukkan peningkatan yang terjadi dengan nilai yang signifikan hanya terjadi pada perbandingan F2 dengan F3. Keadaan ini tidak dipungkiri terjadi kesalahan mengingat bahwa biopsi hati hanya mewakili 1/50.000 bagian dan fibrosis hati yang terjadi juga tersebar tidak merata (Goodman, 2007).

Perbandingan antara ekspresi kolagen-1 dengan luas fibrosis hati pada masing-masing tikus dibandingkan untuk mengetahui hubungan atau korelasi dari kedua variabel secara langsung. Marker kolagen-1 tidak dibandingkan berdasarkan kelompok fibrosis karena menghindari bias akibat jumlah tiap kelompok yang tidak merata. Sesuai dengan uji korelasi *Spearman* didapatkan hasil bahwa kedua variabel memiliki hubungan yang signifikan ke arah positif

secara statistik. Sehingga dapat disimpulkan bahwa semakin banyak ekspresi kolagen-1 yang ada, maka kejadian fibrosis hati semakin bertambah yang dihitung dengan luas fibrosis. Sesuai dengan landasan teori bahwa produksi ECM, kolagen pembentuk fibrin, serta sitokin proinflamasi meningkat sehingga terjadi deposisi dan berkembang menjadi fibrosis hati (Fujita dan Narumiya, 2016).

6.2 Keterbatasan Penelitian

Penulis mengikuti penelitian pohon yang membahas tentang pengaruh MO terhadap fibrosis hati yang diberikan CCl₄. Dalam hal ini penulis mengikuti arahan bagaimana tikus menjadi fibrosis sehingga tidak mengetahui persebaran derajat fibrosis yang terjadi pada masing-masing kelompok perlakuan. Pembagian tikus di awal berdasarkan kelompok perlakuan juga tidak sepenuhnya randomisasi dikarenakan masih ada campur tangan peneliti dalam membagi rata tikus menurut berat badannya. Selain itu, persebaran derajat fibrosis juga berpengaruh pada pembagian kelompok tikus menurut skor Metavir sehingga data yang diperoleh belum bisa mewakili kelompok tersebut. Peneliti belum berpengalaman melakukan pengecatan imunohistokimia sehingga terdapat beberapa kesalahan teknis yang terjadi pada beberapa jaringan hati tikus. Penghitungan ekspresi kolagen-1 juga cenderung masih bersifat subjektif karena penghitungan manual oleh peneliti. Pengukuran skor Metavir juga dinilai masih terdapat subjektivitas karena hanya satu ahli patologi anatomi saja yang mengukur.

BAB 7

KESIMPULAN DAN SARAN

7.1 Kesimpulan

Dari penelitian yang telah dilakukan, dapat disimpulkan bahwa ekspresi kolagen-1 berbanding lurus dengan luas fibrosis dan derajat fibrosis, sehingga semakin luas fibrosis yang terjadi, semakin banyak ekspresi kolagen-1 jika dibandingkan pada masing-masing tikus berdasarkan luas fibrosisnya. Begitu pula sebaliknya, semakin banyak ekspresi kolagen-1 yang terlihat, maka semakin luas fibrosisnya dan semakin besar derajat fibrosis yang terjadi

7.2 Saran

1. Penelitian selanjutnya dibutuhkan untuk mengetahui ekspresi kolagen-1 dengan derajat fibrosis secara kelompok dengan sebaran jumlah tikus yang sama pada masing-masing kelompok.
2. Perlu dilakukan penghitungan ekspresi kolagen-1 oleh beberapa orang untuk menghindari subjektivitas penelitian atau dapat dihitung otomatis dengan computer dengan pemilihan area yang tepat.
3. Pengukuran skor Metavir dapat ditentukan oleh lebih dari dua ahli untuk menghindari subjektivitas yang tinggi.
4. Perlu perhatian khusus dalam pengecatan imunohistokimia agar tidak terjadi hasil yang tidak diinginkan (kurangnya ekspresi atau terlalu lebih akibat pewarnaannya).
5. Dapat dilakukan metode lain dalam melihat ekspresi kolagen-1 agar lebih jelas terlihat dalam jaringan hati.

DAFTAR PUSTAKA

- Anonymous, 2012. CEVHAP (Coalition to Eradicate Viral Hepatitis in Asia Pasific). *Fast facts about Hepatitis B and Hepatitis C*, (Online), (<http://www.cevhap.org/index.php/en/home/fast-facts-about-hepatitis-b-and-hepatitis-c>, diakses 11 April 2019)
- Ayala, A., Muñoz, M. F. dan Argüelles, S. Lipid Peroxidation: Production, Metabolism, and Signaling Mechanisms of Malondialdehyde and 4-Hydroxy-2-Nonenal. *Hindawi Publishing Corporation, Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2014, Volume 2014.
- Arriazu, E., de Galarreta, M. R., Cubero, F. J., Varela-Rey, M., de Obanos, M. P. P., Leung, T. M., *et al.* Extracellular Matrix and Liver Disease. *Antioxidants & Redox Signaling*, 2013, 00 (00)
- Asselah, T., Bieche, I., Sabbagh, A., Bedossa, P., Moreau, R., Valla, D., *et al.* Gene expression and hepatitis C virus infection. *Gut*, 2009; 58:846–858.
- Baranova, A., Lal, P., Birerdinc, A. dan Younossi, Z. M. Non-Invasive markers for hepatic fibrosis. *BMC Gastroenterology*, 2011, 11: 91.
- Bataller R., dan Brenner, D. A. Liver fibrosis. *The Journal of Clinical Investigation*, 2005, 115 (2).

Birukawa, N. K., Murase, K., Sato, Y., Kosaka, A., Yoneda, A., Nishita, H., *et al.* Activated Hepatic Stellate Cells Are Dependent on Self-collagen, Cleaved by Membrane Type 1 Matrix Metalloproteinase for Their Growth. *The Journal Of Biological Chemistry*, 2014, 289(29): 20209–20221

Blachier, M., Leleu, H., Peck-Radosavljevic, M., Valla, DC. dan Roudot-Thoraval, F. The burden of liver disease in Europe: A review of available epidemiological data. *Elsevier. Journal of Hepatology*, 2013, 58: 593–608.

Boyer, T. D., Mannas, M. P., Sanyal, A. J. 2012. Zakim and Boyer's Hepatology, 6th Ed. A Textbook of Liver Disease - Expert Consult: Online and Print . Saunders.

Czaja, A. J. Hepatic inflammation and progressive liver in chronic liver disease. *World Journal of Gastroenterology*, 2014, 20 (10): 2515-2532.

Duarte, S., Baber, J., Fujii, T. dan Coito, A. J. Matrix metalloproteinases in liver injury, repair and fibrosis. *Matrix Biol.*, 2015, 0: 147-156.

Duval, F., Moreno-Cuevas, J. E, González-Garza, M. T., Rodríguez-Montalvo, C. dan Cruz-Vega, M. T. Protective mechanisms of medicinal plants targeting hepatic stellate cell activation and extracellular matrix deposition in liver fibrosis. *Chinese Medicine*. 2014, 9: 27.

Domitrović, R., Jakovac, H. dan Tomac, J., Š. Liver Fibrosis in Mice Induced by Tetrachloride and Its Reversion by Luteolin. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 2009, 241: 311-321.

Fritz, D. J. 2008 *Novel Mechanisms of Type I Collagen Regulation in Liver Fibrosis* . Disertasi. Tesis Elektronik, The Florida State University, Florida

Fujita T. dan Narumiya S. Roles of hepatic stellate cells in liver inflammation: a new perspective. *Inflammation and Regeneration*, 2016, 36 (1)

Goodman, Z. D. Grading and staging systems for inflammation and fibrosis in chronic liver diseases. *Journal of Hepatology*, 2007, 47: 598-607

Hamza, A. A. Ameliorative effects of Moringa oleifera Lam seed extract on liver fibrosis in rats, Food and Chemical Toxicology, *Elsevier*, 2010, 48 :345–355.

Hernandez-gea, V. dan Friedman, S. L. Pathogenesis of Liver Fibrosis. *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.*, 2011, 6: 425–56

Jaeschke, H. Reactive Oxygen and Mechanisms of Inflammatory Liver Injury. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 2000, 15: 718-724.

- Karsdal, M.A. , Genovese, F., Madsen, E.A., Manon-Jensen, T., Schuppan, D. Collagen and tissue turnover as a function of age: implications for fibrosis. *J. Hepatol*, 2016, 64 (2016) :103–109
- Karsdal , M. A., Nielsen, S.H., Leeming, D.J., Langholma, L.L., Nielsen, M. J., Manon-Jensen, T., *et al.* The good and the bad collagens of fibrosis – Their role in signaling and organ function. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2017.
- Karsdal, M. A., Nielsen, M. J., Sand, J. M., Henriksen, K., Genovese, F., Bay-Jensen, AC. Extracellular Matrix Remodeling: The Common Denominator in Connective Tissue Diseases Possibilities for Evaluation and Current Understanding of the Matrix as More Than a Passive Architecture, but a Key Player in Tissue Failure. *Mary Ann Liebert, Inc*, 2013, 11 (2).
- Liu, T., Wang, X., Karsdal, M. A., Leeming, D. J. dan Genevose, F. Molecular Serum Markers of Liver Fibrosis. *Biomarker Insights*, 2012, 7: 105-117
- Magee, N., Zou, A., Zhang, Y. Pathogenesis of Nonalcoholic Steatohepatitis: Interactions between Liver Parenchymal and Nonparenchymal Cells, *BioMed Research International*, 2016, Volume 2016,
- Maiyo, F C., Moodly, R. and Singh, M. Cytotoxicity, Antioxidant and Apoptosis Studies of Quercetin-3-O Glucoside and 4-(β -D-

Glucopyranosyl-1→4-α-L-Rhamnopyranosyloxy)-Benzyl

Isothiocyanate from *Moringa oleifera*, 2016, 16: 648-656

Mokdad, A. A., Lopez, A. D., Shahrzad, S., Lozano, R., Mokdad, A. H., Stanaway, J., Murray, C. J. L. dan Naghavi, M. Liver cirrhosis mortality in 187 countries between 1980 and 2010: a systematic analysis. *BMC Medicine*, 2014, 12:145.

Nielsen, F., Mikkelsen, B. B., Nielsen, J. B., Andersen, H. R. and Grandjean, P. Plasma Malondialdehyde as Biomarker for Oxidative Stress: Reference Interval and Effects of life-style factors, *Clinical Chemistry*, 1997, 43(7): 1209-1214.

Pinzani, M. Pathophysiology of liver fibrosis. *Digestive Disease*, 2015, 33: 492- 497.

Premila, A. G. dan Wilfred, C. Oxidative damage to the lipids and proteins of the lungs, testis and kidney of rats during carbon tetrachloride intoxication. *Clinica Chimica Acta*, 1999, 289: 177-179

Ricard-blum, S. The Collagen Family. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2011, 3.

Sánchez-Valle, V., Chávez-Tapia, N.C., Uribe M. dan Méndez-Sánchez, N. Role of Oxidative Stress and Molecular Changes in Liver Fibrosis: A Review. *Current Medicinal Chemistry*, 2012, 19: 4850-4860.

- Schuppan, D., Rueh, I. M., Somasundaram, R., Hahn, E. G. Matrix as a modulator of hepatic fibrogenesis. *Semin Liver Dis.*, 2001, 21(3): 351–72.
- Suk, K. T., Kim, D. Y., Sohn, K. dan M., Kim, D. J. Biomarkers of Liver Fibrosis. *Advances in Clinical Chemistry*, 2013, 62.
- Wang, TH., Chen, TC., Teng, X., Liang, KH. dan Yeh, CT. Automated biphasic morphological assessment of hepatitis B-related liver fibrosis using second harmonic generation microscopy. *Scientific Reports*, 2015, 5: 12962
- Wu, J. J., Weis, M. A., Kim, L. S., Eyre, D. R. Type III collagen, a fibril network modifier in articular cartilage. 2009, *J Biol Chem*, 285: 18537–18544.
- Wynn, T. A. Common and unique mechanisms regulate fibrosis in various fibroproliferative diseases. *The Journal of Clinical Investigation*, 2008, 117 (3).
- Yanguas, S. C., Cogliati, B., Willebrords, J., Maes, M., Colle, I., Bossche, B. V. D., *et al.* Experimental models of liver fbrosis. Springer-Verlag Berlin Heidelberg: Arch Toxicol, 2015,
- Zhang, CY., Yuan, WG., He, P., Lei, JH. dan Wang, CX. Liver fibrosis and hepatic stellate cells: Etiology, pathological hallmarks and

therapeutic targets. *World J Gastroenterol* , 2016, 22(48): 10512-10522.

Lampiran 1. Tabel Data Berat Badan Tikus, Derajat Fibrosis, Luas Fibrosis dan Ekspresi Kolagen-1 Tiap Kelompok Perlakuan

PERLAKUAN	TIKUS	BB AWAL (g)	BB AKHIR (g)	EKSPRESI KOLAGEN-1 (%)	MEAN EKSPRESI KOLAGEN-1 (%)	DERAJAT FIBROSIS	Luas Fibrosis (μm^2)
K- NEGATIF	1 (KNEG 1)	143	368	9.02	9.99	F0	981.37
	2 (KNEG 2)	175	268	12.48		F0	978.96
	3 (KNEG 3)	204	380	8.60		F0	944.05
	4 (KNEG 4)	201	363	7.92		F0	949.79
	5 (KNEG 5)	246	392	9.99		F0	927.94
	6 (KNEG 6)	205	338	12.12		F0	969.59
K-POSITIF	1 (KPOS 1)	183	241	19.35	20.71	F3	60928.99
	2 (KPOS 2)	182	294	16.39		F3	62812.01
	3 (KPOS3)	181	362	16.84		F3	57220.38
	4 (KPOS 4)	194	288	26.36		F3	51457.5
	5 (KPOS 5)	190	334	26.41		F3	62532.61
	6 (KPOS 6)	188	317	18.89		F3	53568.14
K- PERLAKUAN 1	1 (KP1-1)	216	349	12.78	19.64	F3	57234.81
	4 (KP1-2)	246	324	21.48		F3	53114.71
	3 (KP1-3)	182	219	19.59		F3	50344.35
	4 (KP1-4)	182	326	31.21		F3	56434.59
	5 (KP1-5)	171	326	20.65		F3	49153.57
	6 (KP1-6)	178	309	12.15		F3	50687.54
K- PERLAKUAN 2	1 (KP2-1)	164	380	23.13	15.11	F3	44085.85
	2 (KP2-2)	210	313	13.89		F3	51996
	3 (KP2-3)	213	291	14.78		F2	23228.01
	4 (KP2-4)	175	298	15.61		F3	49840.02
	5 (KP2-5)	159	280	11.62		F3	45808.36
	6 (KP2-6)	150	232	11.67		F3	38613.09
K- PERLAKUAN 3	1 (KP3-1)	179	298	9.50	9.27	F1	8065.91
	2 (KP3-2)	183	293	8.56		F1	8195.25
	3 (KP3-3)	172	336	10.60		F2	21614.48
	4 (KP3-4)	254	330	7.94		F2	21119.19
	5 (KP3-5)	232	310	7.38		F2	21435.06
	6 (KP3-6)	154	195	11.65		F2	22681.43

Lampiran 2. Data perhitungan statistik dengan SPSS

Tabel 1. Rerata ekspresi kolagen-1 dan luas fibrosis kelompok F0

Statistics			
		Kolagen-1	Luas Fibrosis
N	Valid	6	6
	Missing	0	0
Mean		10.0217	958.6167
Std. Deviation		1.89150	21.36883
Variance		3.578	456.627
Range		4.56	53.43
Minimum		7.92	927.94
Maximum		12.48	981.37

Tabel 2. Rerata ekspresi kolagen-1 dan luas fibrosis kelompok F1

Statistics			
		Kolagen-1	Luas Fibrosis
N	Valid	2	2
	Missing	0	0
Mean		9.0300	8130.5800
Std. Deviation		.66468	91.45719
Variance		.442	8364.418
Range		.94	129.34
Minimum		8.56	8065.91
Maximum		9.50	8195.25

Tabel 3. Rerata ekspresi kolagen-1 dan luas fibrosis kelompok F2

Statistics			
		Kolagen-1	Luas Fibrosis
N	Valid	5	5
	Missing	0	0
Mean		10.4700	22015.6340

Std. Deviation	2.99727	896.48514
Variance	8.984	803685.606
Range	7.40	2108.82
Minimum	7.38	21119.19
Maximum	14.78	23228.01

Tabel 4. Rerata ekspresi kolagen-1 dan luas fibrosis kelompok F3

Statistics			
		Kolagen-1	Luas Fibrosis
N	Valid	17	17
	Missing	0	0
Mean		18.7071	52696.0306
Std. Deviation		5.73368	6495.45320
Variance		32.875	4.219E7
Range		19.59	24198.92
Minimum		11.62	38613.09
Maximum		31.21	62812.01

Tabel 5. Uji normalitas data ekspresi Kolagen-1

Tests of Normality						
	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
trans_Kolagen	.110	30	.200 [*]	.964	30	.382

a. Lilliefors Significance Correction

*. This is a lower bound of the true significance.

Tabel 6. Uji normalitas data luas fibrosis hati

Tests of Normality						
	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
trans_Luas_Fibrosis	.274	30	.000	.710	30	.000

a. Lilliefors Significance Correction

Tabel 7. Uji homogenitas ekspresi Kolagen-1**Test of Homogeneity of Variances**

trans_Kolagen

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
1.678	3	26	.196

Tabel 8. Uji *one-way Anova* ekspresi kolagen-1**ANOVA**

trans_Kolagen					
	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.503	3	.168	11.688	.000
Within Groups	.373	26	.014		
Total	.876	29			

Tabel 9. Uji *Tukey* ekspresi kolagen-1

trans_Kolagen

Tukey HSD^{a,b}

Skor Metavir	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
F-1	2	.9551	
F-0	6	.9946	
F-2	5	1.0058	
F-3	17		1.2531

Sig.		.924	1.000
------	--	------	-------

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

- a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 4.322.
- b. The group sizes are unequal. The harmonic mean of the group sizes is used. Type I error levels are not guaranteed.

Tabel 10. Uji LSD ekspresi kolagen-1

Multiple Comparisons

trans_Kolagen

LSD

(I) Skor Metavir	(J) Skor Metavir	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
F-0	F-1	.03952	.09778	.689	-.1615	.2405
	F-2	-.01122	.07251	.878	-.1603	.1378
	F-3	-.25853 [*]	.05686	.000	-.3754	-.1416
F-1	F-0	-.03952	.09778	.689	-.2405	.1615
	F-2	-.05074	.10019	.617	-.2567	.1552
	F-3	-.29805 [*]	.08952	.003	-.4821	-.1140
F-2	F-0	.01122	.07251	.878	-.1378	.1603
	F-1	.05074	.10019	.617	-.1552	.2567
	F-3	-.24731 [*]	.06092	.000	-.3725	-.1221
F-3	F-0	.25853 [*]	.05686	.000	.1416	.3754
	F-1	.29805 [*]	.08952	.003	.1140	.4821
	F-2	.24731 [*]	.06092	.000	.1221	.3725

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

Tabel 11. Uji *Kruskal-Wallis* luas fibrosis

Test Statistics ^{a,b}	
	Luas Fibrosis
Chi-Square	23.374
df	3
Asymp. Sig.	.000

a. Kruskal Wallis Test

b. Grouping Variable: Skor

Metavir

Tabel 12. Uji *Mann-Whitney* Kelompok F0 dan F1

Test Statistics ^b	
	Luas Fibrosis
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	21.000
Z	-2.000
Asymp. Sig. (2-tailed)	.046
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.071 ^a

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: Skor Metavir

Tabel 13. Uji *Mann-Whitney* Kelompok F0 dan F2

Test Statistics ^b	
	Luas Fibrosis
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	21.000
Z	-2.739
Asymp. Sig. (2-tailed)	.006
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.004 ^a

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: Skor Metavir

Tabel 14. Uji *Mann-Whitney* Kelompok F0 dan F3

Test Statistics ^b	
	Luas Fibrosis
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	21.000
Z	-3.571
Asymp. Sig. (2-tailed)	.000
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.000 ^a

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: Skor Metavir

Tabel 15. Uji *Mann-Whitney* Kelompok F2 dan F1

Test Statistics ^b	
	Luas Fibrosis
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	3.000
Z	-1.936
Asymp. Sig. (2-tailed)	.053
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.095 ^a

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: Skor Metavir

Tabel 16. Uji *Mann-Whitney* Kelompok F3 dan F1

Test Statistics ^b	
	Luas Fibrosis
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	3.000
Z	-2.258
Asymp. Sig. (2-tailed)	.024
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.012 ^a

- a. Not corrected for ties.
b. Grouping Variable: Skor Metavir

Tabel 17. Uji *Mann-Whitney* Kelompok F3 dan F2

Test Statistics ^b	
	Luas Fibrosis
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	15.000
Z	-3.330
Asymp. Sig. (2-tailed)	.001
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.000 ^a

- a. Not corrected for ties.
b. Grouping Variable: Skor Metavir

Tabel 18. Uji *independent* T-test ekspresi kolagen-1 kelompok K-Neg (F0) dengan K-Pos (F3)

Independent Samples Test										
		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means						
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	95% Confidence Interval of the Difference	
									Lower	Upper
Ekspresi Kolagen-1	Equal variances assumed	7.244	.023	-5.318	10	.000	-10.68500	2.00917	-15.16170	-6.20830
	Equal variances not assumed			-5.318	6.683	.001	-10.68500	2.00917	-15.48205	-5.88795

Tabel 19. Statistik K-Neg dan K-pos

Group Statistics					
	Kelompok Perlakuan	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
Ekspresi Kolagen-1	K-Negatif (F0)	6	10.0217	1.89150	.77220
	K-Positif (F3)	6	20.7067	4.54343	1.85485

Tabel 20. Uji korelasi *Spearman* kolagen-1 dengan luas fibrosis

Correlations			Kolagen-1	Luas Fibrosis
Spearman's rho	Kolagen-1	Correlation Coefficient	1.000	.756**
		Sig. (2-tailed)	.	.000
		N	30	30
	Luas Fibrosis	Correlation Coefficient	.756**	1.000
		Sig. (2-tailed)	.000	.
		N	30	30

** . Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed).

Lampiran 3. Dokumentasi Penelitian

Gambar 1. Organ Hati Tikus



Gambar 2. Kandang tikus



Gambar 3. Perlakuan sonde



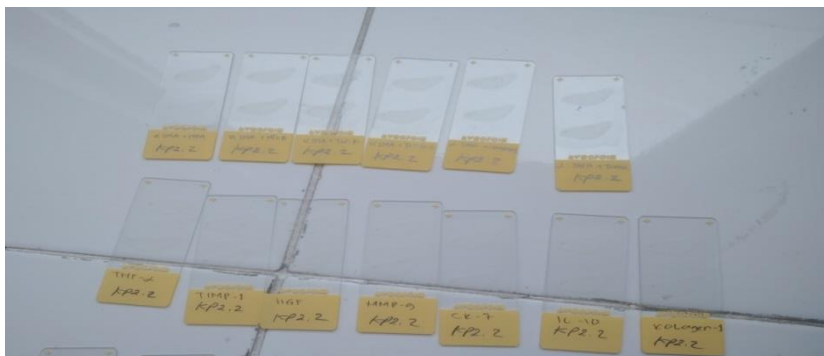
Gambar 4. Proses IHK



Gambar 5. Pembedahan tikus dan penyimpanan organ



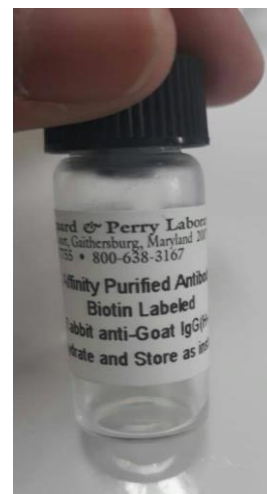
Gambar 6. Pembuatan preparat histologi



Gambar 7. Antibodi primer

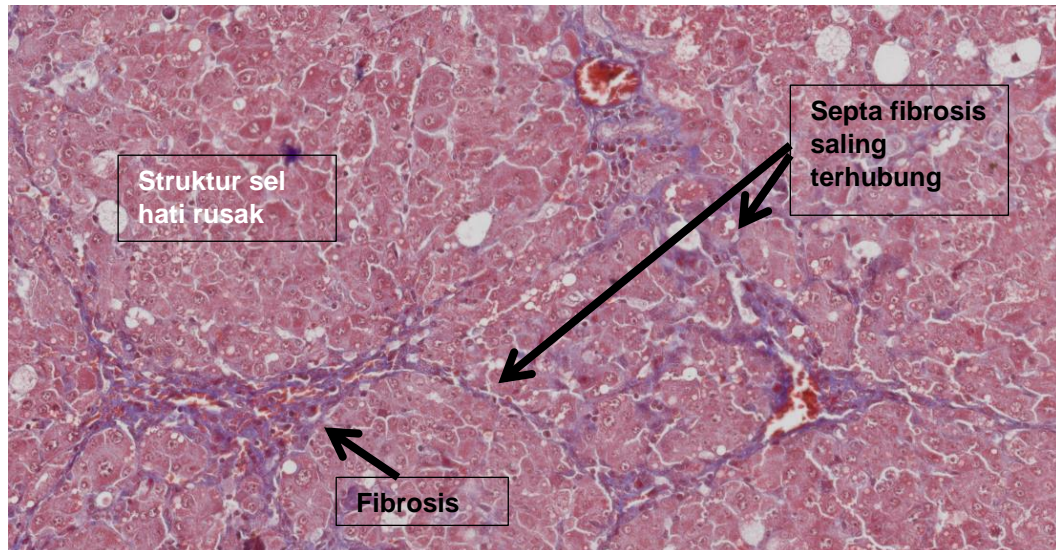


Gambar 8. Antibodi sekunder



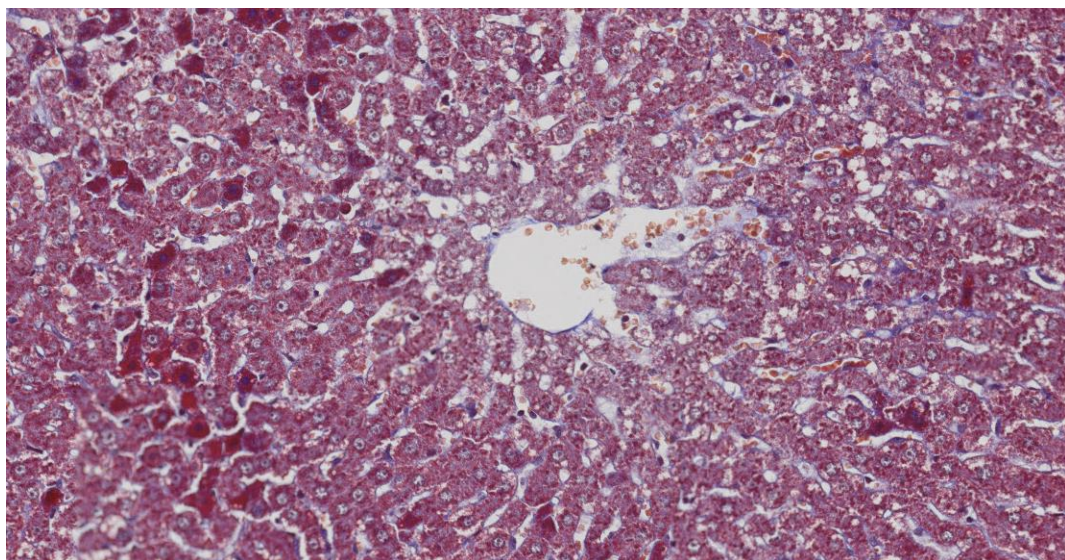
Lampiran 4. Hasil Pembacaan Fibrosis Hati

Gambar 1. Kelompok Positif (F3)



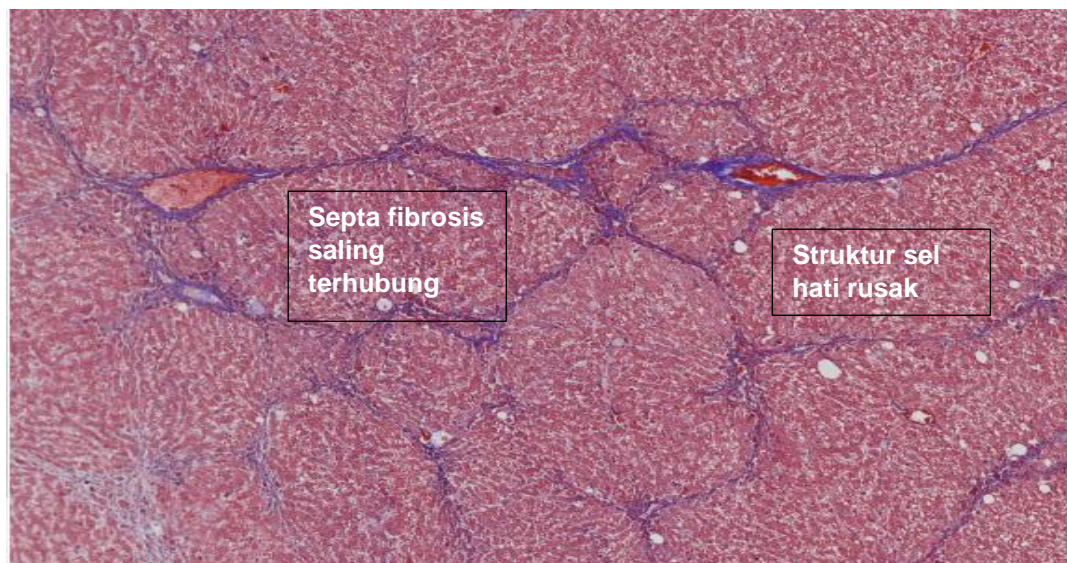
F3: Terbentuk beberapa septa fibrosis yang saling terhubung, kerusakan intralobular

Gambar 2. Kelompok Negatif (F0)



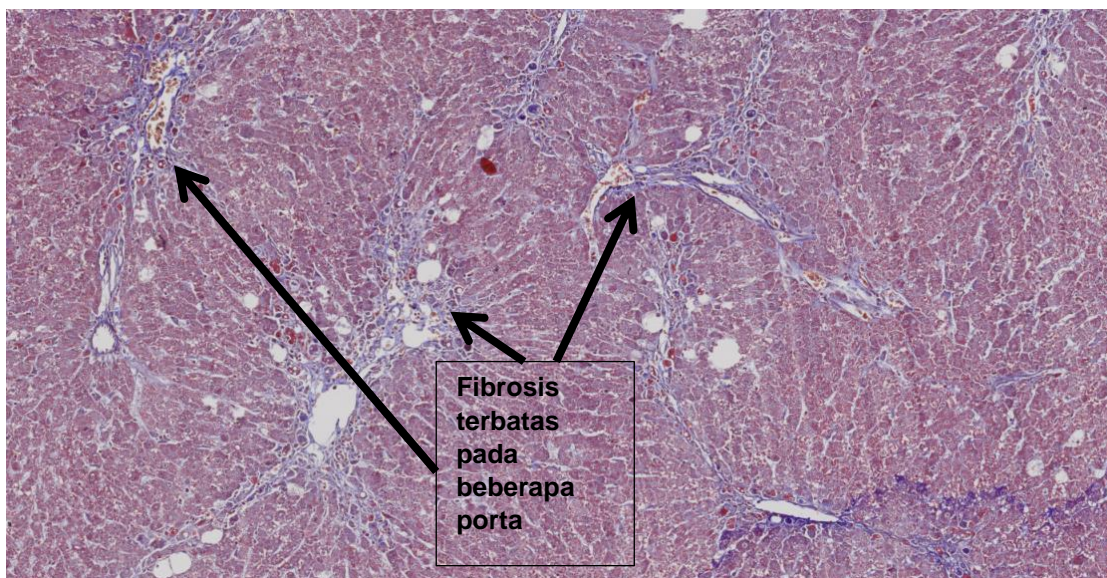
F0: Hepatosit terlihat jelas, tidak ada tanda-tanda fibrosis, tidak ada perubahan struktur lobus

Gambar 3. Kelompok Perlakuan 1 (F3)



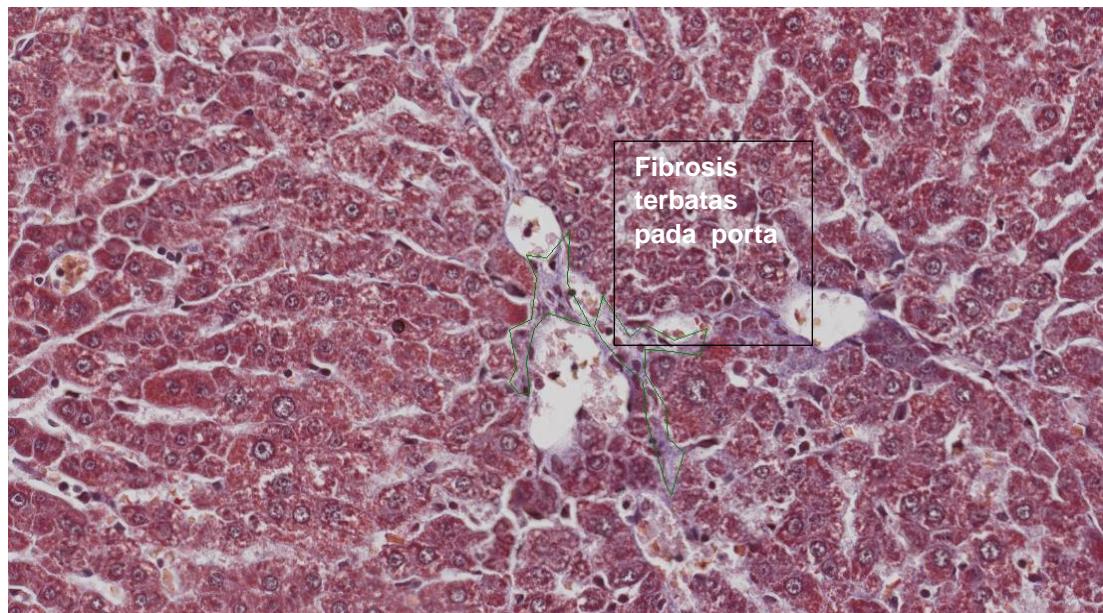
F3: Terbentuk beberapa septa fibrosis yang saling terhubung, kerusakan intralobular

Gambar 4. Kelompok Perlakuan 2 (F2)



F2: Beberapa fibrosis perifer di area porta, terbentuk area fibrosa, membentuk septum

Gambar 5. Kelompok Perlakuan (F1)



F1: jaringan fibrosa daerah porta melebar

Lampiran 5. Etik



KEMENTERIAN RISET, TEKNOLOGI, DAN PENDIDIKAN TINGGI
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
FAKULTAS KEDOKTERAN
KOMISI ETIK PENELITIAN KESEHATAN

Jalan Veteran Malang - 65145, Jawa Timur - Indonesia
Telp. (62) (0341) 551611 Ext. 168; 569117; 567192 - Fax. (62) (0341) 564755
http://www.fk.ub.ac.id e-mail : kep.fk@ub.ac.id

KETERANGAN KELAIKAN ETIK
("ETHICAL CLEARANCE")

No. 153A / EC / KEPK / 06 / 2018

KOMISI ETIK PENELITIAN KESEHATAN FAKULTAS KEDOKTERAN UNIVERSITAS BRAWIJAYA, SETELAH MEMPELAJARI DENGAN SEKSAMA RANCANGAN PENELITIAN YANG DIUSULKAN, DENGAN INI MENYATAKAN BAHWA PENELITIAN DENGAN

JUDUL : Potensi Ekstrak Etanol Daun *Moringa oleifera* Lamk. dalam Menghambat Progresivitas Fibrosis Hati dan Studi Efek Sampingnya terhadap Penurunan Fungsi Ginjal pada Tikus Model Fibrosis Hati.

PENELITI UTAMA : dr. Supriono, Sp.PD-KGEH

ANGGOTA :

- | | | |
|---------------------------------|-----------------------------------|---------------------------|
| 1. dr. Yeni Larasati | 9. dr. Amanda Cininta Wowor | 17. Florecentia Candra M |
| 2. dr. Nadia Zerlinda Mustamsir | 10. dr. Fikri Baladraf | 18. Muhammad Irfan D |
| 3. dr. Rifal Renaldi | 11. dr. Ponda Hernest Hadinata | 19. Zalfa Daulah |
| 4. dr. Edy Susanto | 12. Febryana Nur Safitri, S.Ked | 20. Azkiya Zahra |
| 5. dr. Rahmantio Adi | 13. Lestari Kanti Wilujeng, S.Ked | 21. Zuke Ulva Diana |
| 6. dr. Safarina Kharima Laitupa | 14. Mokhamad Fahmi Rizki S | 22. Alya Safira |
| 7. dr. Ayu Cahya Andhayani | 15. Kartika Widyasari | 23. Yunita Lestari I |
| 8. dr. Ade Rahmawati | 16. Muthi'ah Adira Juwono | 24. Ruth Clarita Pradibdo |
| | | 25. Doharni Olivia N |

UNIT / LEMBAGA : Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang.

TEMPAT PENELITIAN : Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang.

DINYATAKAN LAIK ETIK.

Malang,
Ketua,

28 JUN 2018

Prof. Dr. dr. Moch. Istiadjud ES, SpS, SpBS(K), SH, M.Hum, Dr.H.
NIK. 160746683

Catatan :

Keterangan Laik Etik Ini Berlaku 1 (Satu) Tahun Sejak Tanggal Dikeluarkan Pada Akhir Penelitian, Laporan Pelaksanaan Penelitian Harus Diserahkan Kepada KEPK-FKUB Dalam Bentuk Soft Copy. Jika Ada Perubahan Protokol Dan / Atau Perpanjangan Penelitian, Harus Mengajukan Kembali Permohonan Kajian Etik Penelitian (Amandemen Protokol)